ORSAY
n° d'ordre : 282

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

T H E S E

présentée

Pour obtenir

Le titre de DOCTEUR d'UNIVERSITE

PAR

Madame GOUAILLARDOU Dominique

=====**=====

SUJET : Etude de la complexation de l'étain stanneux et du technétium 99m par l'hydroxyméthylène diphosphonate (H.M.D.P.). Propriétés physico-chimiques et comportement biologique des complexes.

soutenue le 2 décembre 1983 devant la Commission d'examen

MM.	GENET	Président
Me	CONTI	
M.	BARDY	
M.	VIDAL	

UNIV.
LIBRARY

ETUDE DE LA COMPLEXATION DE L'ETAIN STANNEUX

ET DU

TECHNETIUM 99 m PAR L'HYDROXYMETHYLENE DIPHOSPHONATE (H.M.D.P.)

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

ET COMPORTEMENT BIOLOGIQUE DES COMPLEXES

Madame Dominique GOUAILLARDOU

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Recherche et de Développement de l'Office des Rayonnements Ionisants du Commissariat à l'Energie Atomique à Saclay , sous la direction de Mme M.L. Conti et M.M. Genêt , Professeur à la Faculté d'Orsay , M.A. Bardy , Responsable de la Section Recherche et Développement .

Je les prie d'accepter le témoignage de ma gratitude pour les encouragements et les conseils qu'ils m'ont prodigués pendant ce travail .

J'adresse à M.Yves Le Gallic et M. Michel Bourdoiseau qui m'ont donné leur accord pour la réalisation de ce travail , l'expression de mes remerciements respectueux .

A M.M. Vidal , Professeur à l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble , qui me fait l'honneur de bien vouloir accepter de faire partie du jury , j'adresse mes plus vifs remerciements .

Je remercie Mme Carette , Mme Lecayon et M. Bruneau pour leur aide technique et leur coopération au cours de ce travail .

Mes remerciements vont aussi à tous mes camarades des laboratoires Recherche et Développement pour leur amicale collaboration .

S O M M A I R E

INTRODUCTION 1

I - LE TECHNETIUM ET LES PRODUITS RADIOPHARMACEUTIQUES

I.1. - Propriétés physiques 3

I.2. - Propriétés chimiques 7

I.2.1. - Réduction du technétium 7

I.2.1.1. - La réduction du $SnCl_2$ en milieu chlorhydrique et en milieu non complexant 7

I.2.1.2. - En milieu complexant 8

I.2.1.2.1. - Le chlorure d'étain 8

I.2.1.2.2. - Le dithionite de sodium 9

I.3. - Constitution et analyse des produits pharmaceutiques à base de technétium 11

I.3.1. - Analyse des matières premières 11

I.3.2. - Analyse des constituants de la trousse 11

I.3.3. - Rendement de marquage 11

I.3.4. - Identification 11

I.4. - Produits pharmaceutiques présentant un tropisme osseux 12

I.4.1. - Bibliographie 12

I.4.2. - Conclusion 15

II. - ANALYSE DE LA MATIERE PREMIERE

II.1. - Introduction 16

II.2. - Caractéristiques de la matière première 16

II.2.1. - Identification 17

II.2.1.1. - Spectre infra rouge 17

II.2.1.2. - Chromatographie 22

II.2.2. - Analyse quantitative 23

II.2.2.1. - Contenu en H.M.D.P. 23

II.2.2.2. - Contenu en sodium 24

II.2.2.3. - Contenu en eau 26

II.2.2.4. - Contenu en C.D.P. 26

II.2.2.5. - Contenu en métaux lourds 27

II.2.2.6. - Conclusion 27

III. - ANALYSE DES COMPOSES DE LA TROUSSE

III.1. - Préparation de la trousse 28

III.2. - Analyse des constituants de la trousse 29

III.2.1. - Détermination du contenu en H.M.D.P. 29

III.2.1.1. - Principe 29

III.2.1.2. - Protocole expérimental 32

III.2.1.2.1. - Réactifs

III.2.1.2.2. - Mode opératoire

III.2.1.2.3. - Etalonnage

III.2.1.3. - Résultats 33

III.2.1.3.1. - Dosage du H.M.D.P seul

III.2.1.3.2. - Dosage du H.M.D.P en présence d'acide ascorbique

III.2.1.3.3. - Dosage par la méthode d'oxydation

III.2.1.3.4. - Dosage par la méthode des ajouts

III.2.1.3.5. - Conclusion

III.2.2. - Détermination des contenus en étain stanneux et en acide ascorbique dans la trousse 37

III.2.2.1. - Principe 37

III.2.2.1.1. - Dosage à l'étain stanneux 38

III.2.2.1.1.1 - Protocole expérimental

III.2.2.1.1.2 - Résultats

III.2.2.1.1.3 - Conclusion

III.2.2.1.2. - Dosage de l'acide ascorbique 41

III.2.2.1.2.1 - Protocole expérimental

III.2.2.1.2.2 - Conclusion

III.3. - Rendement de marquage 43

IV. - ETUDE DES COMPLEXES

IV.1. - Méthodes et techniques expérimentales 45

IV.1.1. - Charge des complexes : méthode des résines 45

IV.1.1.1. - Principe 45

IV.1.1.2. - Conditionnement et choix de la résine 46

IV.1.1.3. - Mode opératoire 48

IV.1.1.4. - Vérification de la méthode par la mesure de la charge de l'ion Tc O_4^- 49

IV.1.1.5. - Mesure de la charge du H.M.D.P. seul 49

IV.1.1.6. - Mesure de la charge du complexe H.M.D.P. - Sn 51

IV.1.1.7. - Mesure de la charge du complexe H.M.D.P. - Sn - Tc.

IV.1.1.8. - Mesure de la charge du complexe avec Tc entraineur

IV.1.1.9. - Mesure de la charge du complexe H.M.D.P. - Sn - Tc acide ascorbique 52

IV.2. - Etude de formulation 55

IV.2.1. - Principe 55

IV.2.2. - Mode opératoire et résultats 57

IV.2.3. - Conclusion 57

IV.3. - Réduction avec le dithionite de sodium 58

IV.4. - Comparaison de certains produits commercialisés 60

V. - STRUCTURE DES COMPLEXES

V.1. - Précipitation à l'aide d'un contre-ion de cobalt 62

V.1.1. - Principe 62
V.1.2. - Mode opératoire 62
V.1.3. - Résultats 63
V.1.4. - Discussion 63

VI. - LA PERMEATION SUR GEL

VI.1 - Principe 64

VI.2 - Protocole 65

VI.3 - Résultats 66

VI.4 - Conclusion 67

VII. - ANALYSE BIOLOGIQUE

VII.1 - Analyse biologique à la gamma caméra 70

VII.1.1. - Principe 70
VII.1.2. - Protocole 70
VII.1.3. - Résultats 71
VII.1.4. - Discussion 71

VII.2. - Analyse biologique par biodistribution 71

VII.2.1. - Protocole 71
VII.2.2. - Résultats 72
VII.2.3. - Discussion 78

VII.3. - Analyse biologique par circulation extracorporelle 78

VII.3.1. - Principe 78
VII.3.2. - Protocole 78
VII.3.3. - Résultats 79
VII.3.4. - Discussion 81

VIII.- CONCLUSION 85

BIBLIOGRAPHIE 87

INTRODUCTION

L'importance croissante qu'a prise la médecine nucléaire ces dernières années est due à deux facteurs :

. 1°) L'invention de la caméra à scintillation par ANGER,

. 2°) L'utilisation d'isotopes émetteurs gamma à vie courte.

La scintigraphie, qui est l'obtention d'images par l'intermédiaire d'un radioélément seul ou associé à une molécule vectrice, à l'avantage sur les autres techniques radiographiques de rendre possible l'étude morphologique et fonctionnelle du système biologique.

Parmi les radionucléides commodément accessibles, le technétium 99 m de par ses propriétés nucléaires particulièrement adaptées à l'imagerie est très largement employé. Sa période courte $T\frac{1}{2}$ = 6,007 heures et l'absence de rayonnement β permettent d'administrer de fortes activités (10 - 20 mCi) avec une faible dose d'irradiation du patient. Cette activité fournit un haut flux de rayonnement γ pur de faible énergie qui offre des images de haute résolution. Mais le technétium sous sa forme chimique qui est le pertechnétate de sodium a une utilisation clinique très limitée, aussi l'idée est-elle venue de former des complexes permettant de véhiculer le technétium vers les différents organes et tissus du corps humain.

La complexation présuppose la réduction préalable du pertechnétate TcO_4^- peu réactif, à des degrés d'oxydation inférieurs.

La structure du complexe obtenu dépend principalement de l'agent réducteur, du pH, de la température, de la présence d'oxygène, du rapport agent complexant-métal, de l'ordre d'addition des constitutants et du temps de réaction. Le mélange résultant peut comprendre du pertechnétate, du technétium réduit non complexé ($Tc\ O_2$, $H_2\ O$), des complexes réducteur-agent complexant et un ou plusieurs complexes technétium-agent complexant voire technétium-réducteur-agent complexant (RHODE 1978) (HEINDEL 1978) (TOFE 1974).

L'objet de ce travail est d'étudier l'influence de certains de ces paramètres sur la formation du complexe d'hydroxyméthylène diphosphonate - technétium, d'identifier ce dernier et d'essayer de rétablir une relation entre la structure du complexe et son activité biologique d'une part et d'autre part de développer les méthodes analytiques qui peuvent être utilisées pour définir les propriétés physiques, chimiques relatives à ce complexe.

L'hydroxyméthylène diphosphonate appartient à la série des phosphates inorganiques connus pour former avec le technétium des complexes présentant un tropisme osseux prononcé d'où son grand intérêt clinique.

CHAPITRE I

I - LE TECHNETIUM ET LES PRODUITS RADIOPHARMACEUTIQUES

I.1. - Propriétés physiques

Le technétium 99 m décroît par émission d'un rayonnement gamma mono-énergétique de 142 KeV qui est facilement collimaté et donne une excellente efficacité avec les gamma caméras utilisées actuellement.

Le technétium 99 m formé par désintégration β^- du molybdène 99 a une période $T_{\frac{1}{2}}$ = 67 heures (voir le schéma de désintégration figure 1).

L'arrivée sur le marché de générateurs commerciaux a provoqué une expansion sensible de l'utilisation des composés marqués au ^{99m}Tc. Le système de générateur le plus couramment utilisé consiste en une colonne d'alumine sur laquelle est fixé le molybdène 99. Le ^{99m}Tc est entraîné sous forme de pertechnétate de sodium ($Na\ TcO_4$) à l'aide d'une solution de Na Cl à 9 ‰ et, de $Na\ NO_3$ à 0,5 ‰.

Le générateur est élué quotidiennement, (compte-tenu des périodes du molybdène et du technétium, le maximum d'activité extractible en technétium est atteint au bout de 23 heures).

La durée d'utilisation d'un générateur est environ d'une semaine.

La figure 2 donne le schéma et une vue d'ensemble du générateur commercialisé par l'Office des Rayonnement Ionisants (ORIS) CEA.

Le ^{99} Mo est obtenu de diverses manières :

- Par fission de l'uranium 235

$$^{235}U(n,f) \rightarrow Zr \xrightarrow[\beta^-]{T1/2\ 30\ \text{secondes}} {}^{99}Nb \xrightarrow[\beta^-]{T1/2\ \ 3\ \text{minutes}} {}^{99}Mo$$

avec un rendement de 6 % pour les neutrons thermiques.

- Par activation neutronique sur une cible de molybdène enrichi en isotope 98 :

$$^{98}Mo \quad (n,\gamma) \longrightarrow \quad ^{99}Mo$$

- Par bombardement d'une cible de Mo par des particules chargées dans un cyclotron : par exemple :

$$^{100}Mo \quad (p, 2p) \rightarrow {}^{99}Nb \xrightarrow[\beta^-]{T1/2\ 3\ \text{minutes}} {}^{99}Mo$$

$$^{100}Mo \quad (p, pn) \rightarrow {}^{99}Mo$$

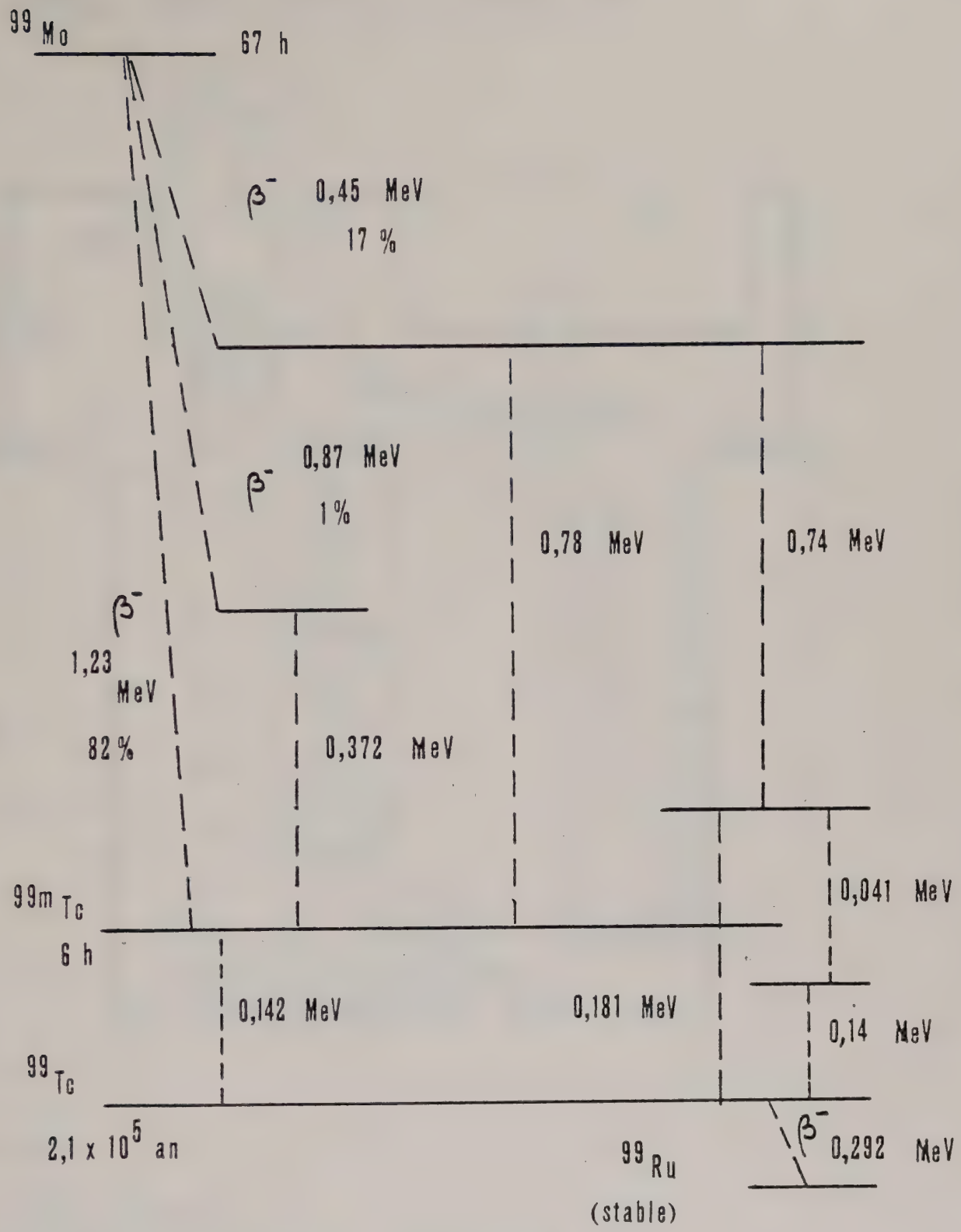
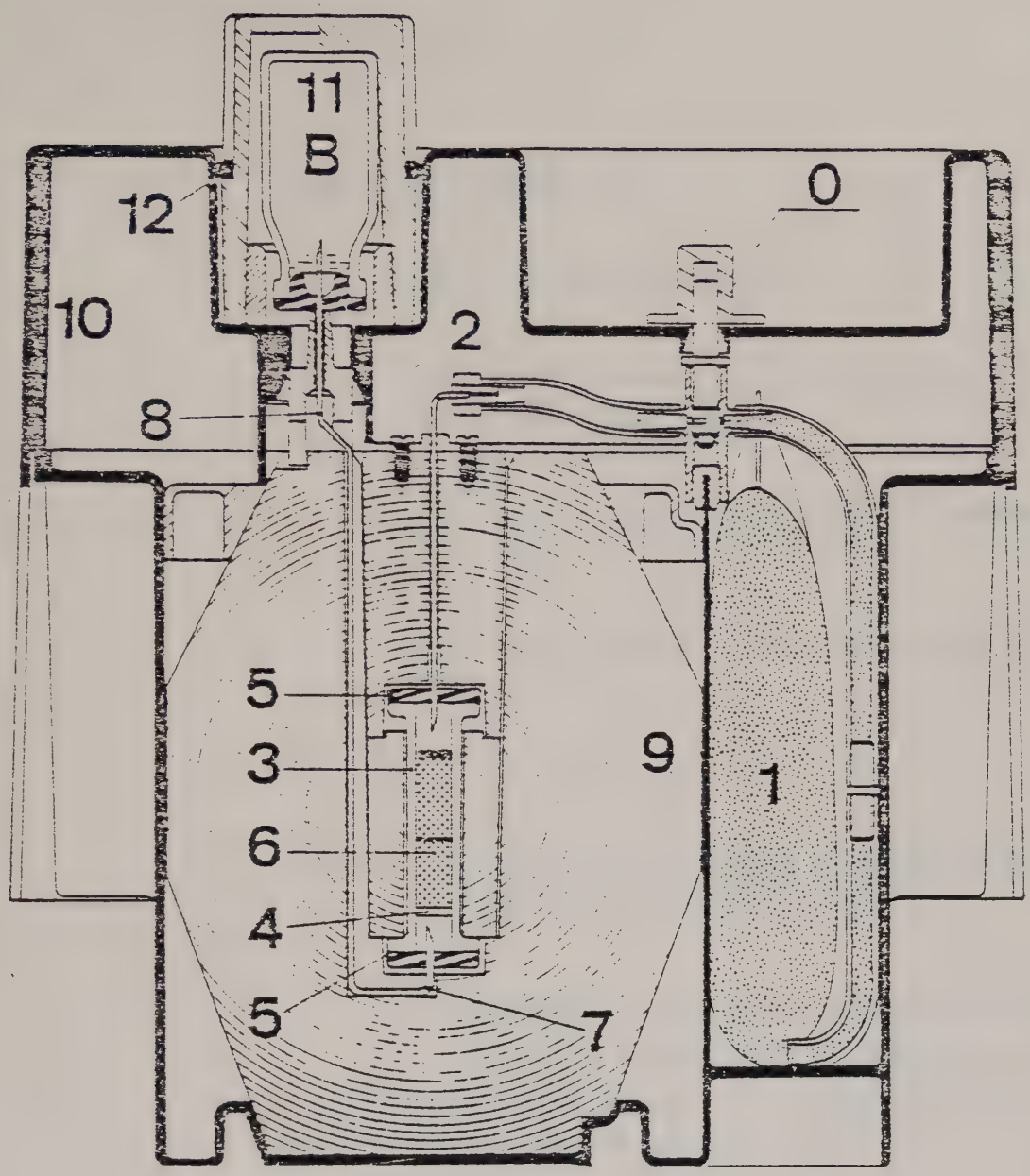


Figure 1 Schéma de désintégration $^{99}Mo \longrightarrow {}^{99m}Tc$

FIGURE 2 - COUPE DU GENERATEUR DE TECHNETIUM 99m



Vue en coupe

0 - Robinet de sécurité
1 - Solution d'élution (Na Cl 9‰ + Na NO_3 0,05 ‰)
2 - Aiguille en acier inoxydable.
3 - Colonne chromatographique.
4 - Filtre en verre fritté.
5 - Capsules métalliques.
6 - Alumine.
7 - Aiguille de sortie de la solution de pertechnétate.
8 - Branchement du flacon sous vide pour élution ou du flacon de bactériostatique.
9 - Protection de plomb.
10 - Habillage en nylon moulé.
11 - Flacon contenant l'éluat.
12 - Joint torique d'étanchéité.

I.2. - Propriétés chimiques

I.2.1. - Réduction du technétium :

Les degrés d'oxydation les plus stables en milieu aqueux sont :

- VII sous forme de pertechnétate heptavalent $Tc\ O_4^-$
- IV sous forme de dioxyde tétravalent $Tc\ O_2$

I.2.1.1. - La réduction par $Sn\ Cl_2$ en milieu chlorhydrique et en milieu non complexant :

Owunwanne (1977) indique que la charge du technétium produit dans la réduction du pertechnétate par l'ion stanneux à $pH \leqslant 2$ en milieu aqueux est égale à + 2.

Il a retenu comme formes possibles :

$Tc\ (OH)_2^{2+}$ et $Tc\ O^{2+}$

Le Tc (VII) est réduit par Sn^{2+} en Tc (IV)

La réaction globale étant :

$$3\ Sn^{2+} + 2\ Tc\ O_4^- + 8\ H^+ \rightleftharpoons 3\ Sn^{4+} + 2\ Tc\ O_2 + 4\ H_2O$$

I.2.1.2. - En milieu complexant

Le marquage des molécules avec le technétium est réalisé à partir d'une solution de pertechnétate $Tc\ O_4^-$ (Tc (VII)).

Les formes réduites du technétium s'associent avec des agents complexants. On obtient des complexes stables du technétium avec des molécules contenant des atomes donneurs en particulier : N, O, S.

Il est difficile de définir les états d'oxydation du technétium complexé car :

. le technétium s'oxyde à l'air facilement

. il peut se former plusieurs complexes à partir du du même agent complexant

. les degrés d'oxydation sont différents selon que l'on est en présence d'un excès d'agent complexant ou du réducteur (STEIGMAN, 1975).

I.2.1.2.1. - Le chlorure d'étain

L'étain Sn (II) permet d'accéder aux degrés d'oxydation :

Tc VII

Tc (V)
Tc (IV)
Tc (III) en milieu complexant

Mais selon trois mécanismes :

. Soit l'étain réduit le technétium qui ensuite réagit seul avec le complexant,

. Soit l'étain se complexe d'abord avec l'agent complexant et le complexe ainsi formé réagit avec le technétium,

. Soit un complexe du type Tc - Sn - agent complexant se forme par réduction avec réaction du $^{99m}_{Tc}$ et du Sn^{2+} avec l'agent.

I.2.1.2.2. - Le dithionite de sodium $Na_2\ S_2\ O_4$

L'avantage de cet agent réducteur est :

. de ne pas former avec le technétium réduit un complexe mixte. Le technétium réduit est seul complexé par la molécule vectrice choisie (agent complexant) Tc - agent complexant.

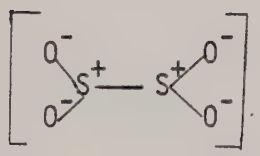
L'inconvénient de ce réducteur est :

. que ces solutions aqueuses ne sont pas stables et se composent rapidement (THORNE, 1948).

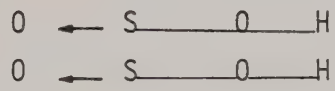
Le dithionite de sodium de formule globale $Na_2\ S_2O_4$ peut s'écrire :

$$\begin{matrix} Na & SO_2 \\ Na & SO_2 \end{matrix}$$

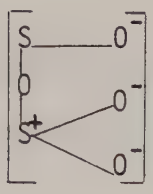
que l'on peut représenter électroniquement



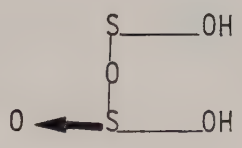
2 Na^+ et l'acide non dissocié serait

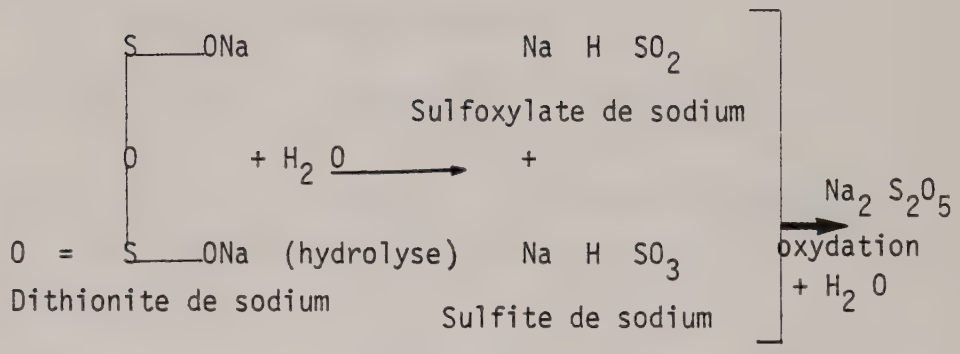


Toutefois un tel composé donnerait par oxydation un dithionate, la formulation actuelle est :



2 Na^+ et celle de l'acide non associé





Le dithionite réduit le technétium à la forme Tc (V)

I.3. - Constitution et analyse des produits radiopharmaceutiques à base de technétium :

Le schéma ci-dessous montre les différentes étapes conduisant à l'élaboration des produits radiopharmaceutiques, ainsi que les analyses correspondantes.

1.3.1. - Analyse des matières premières :

Agent complexant	Réducteur	Antioxydant
H.M.D.P.	$SnCl_2$	acide ascorbique

1.3.2. - Analyse des constituants de la trousse, en tenant compte des diverses interférences qu'occasionne le mélange

Radioélément

Marquage : ^{99m}Tc

1.3.3. - Pureté radiochimique ou rendement de marquage.

1.3.4. - Identification et structure éventuelle du complexe marqué et activité biologique.

En outre, les préparations in vitro des produits radiopharmaceutiques sont caractérisées par les données suivantes :

.Tc à l'échelle des indicateurs, c'est à dire à de très faibles concentrations 10^{-9} à 10^{-10} M.

. pH de la solution de marquage compris entre 3 et 9 (parce que ce sont souvent des solutions injectables par voie intraveineuse).

. Concentration du réducteur 10^{-1} à 10^{-3} M

. Concentration de l'agent complexant 10^{-1} à 10^{-3} M également.

1.4. - Produits pharmaceutiques présentant un tropisme osseux

1.4.1. - Bibliographie

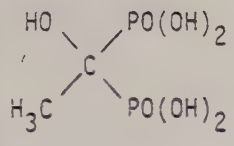
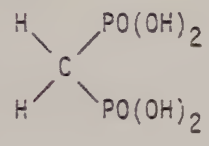
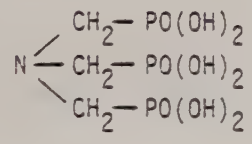
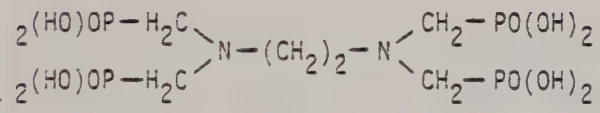
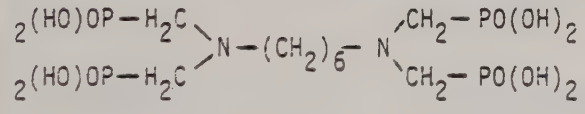
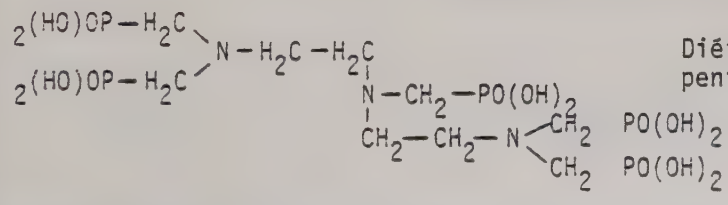
De nombreux produits pharmaceutiques présentant un tropisme osseux ont été décrits dans la littérature de ces dernières années, nous avons regroupé dans le tableau I un certain nombre de ces derniers les plus fréquemment rencontrés.

Dans la liste impressionnante et pourtant incomplète des phosphates et phosphonatesutilisés pour l'imagerie du squelette, certains d'entre eux ont été étudiés et comparés par HOSAIN, P.; WANG, TST (1980).

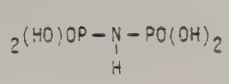
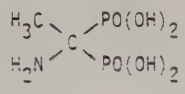
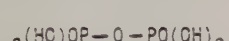
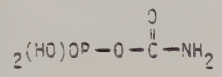
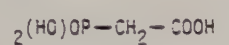
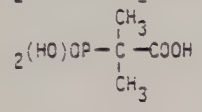
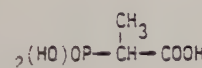
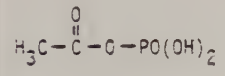
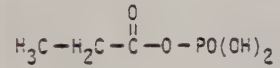
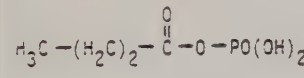
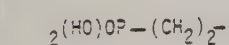
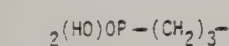
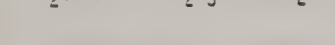
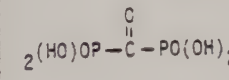
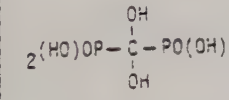
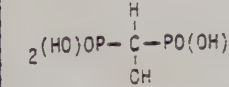
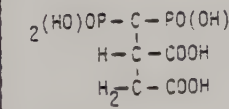
Le tableau II regroupe les données de cette étude chez le rat et deux heures après injection intraveineuse.

TABLEAU I

PRINCIPAUX PRODUITS PRESENTANT UN TROPISME OSSEUX

PRODUIT	FORMULE		
HEDP ou HEDSPA		1 - Hydroxyéthylidène 1 - Diphosphonate	M.A. DAVIS 1976
MDP		Méthylène diphosphonate	II
NTMP		Nitrilotri (méthylène phosphonate)	II
ENTMP ou EDTMP		Ethylénédiamine tétra (méthylène phosphonate)	II
TENTMP ou HMDTMP		Triéthylénédiamine tétra (méthylène phosphonate)	II
DTPMP		Diéthylènetriamine penta (méthylène phosphonate)	II

.../...

PRODUIT	FORMULE		
IDP		Imidodiphosphate.	II
AEDP		Aminoéthyldiphosphonate	II
PiP *		Pyrophosphate	II
CAP		Carbamyl phosphate	(.F. KUNG -1978)
PAA		Phosphonoacétate	II
PPA		2 Phosphonopropionate	II
MPPA		2 méthyl 2 phosphonopropionate	II
		Acétylphosphate	(P.HOSAIN - 1978)
		Propionyl phosphate	II
		Butyryl phosphate	II
EDP		Ethane diphosphonate	(WANG - 1978)
PDP		Propane diphosphonate	II
DDP		Décane diphosphonate	II
-		Carbonyl diphosphonate	(WANG - 1980)
-		Dihydroxyméthyléne diphosphonate	II
HMDP *		Hydroxyméthylène diphosphonate	II
.D.P.D. *		3,3 diphosphonate 1,2 propanedicarboxylique	

* Produit commercialisé sous forme de produits radiopharmaceutiques.

Tableau II

. Biodistribution de la radioactivité chez le rat, deux heures après injection intraveineuse de plusieurs diphosphonates marqués au technétium 99 m.

PRODUITS	% de la dose injectée / g de :		
	Sang	Fémur	Foie
Diisopropylmethylène-diphosphonate (DIPMDP)	0.249 ± 0.046	0.864 ± 0.130	0.192 ± 0.067
Benzylmethylene - diphosphonate (BMDP)	0.213 ± 0.071	0.771 ± 0.078	0.062 ± 0.010
Dichloromethylène-diphosphonate (BCMDP)	0.054 ± 0.010	0.691 ± 0.079	0.025 ± 0.010
Isopropylidène - diphosphonate (IPDP)	0.053 ± 0.008	0.759 ± 0.098	0.029 ± 0.010
Carbonyl - diphosphonate (CDP)	0.071 ± 0.025	0.961 ± 0.015	0.214 ± 0.084
Dihydroxymethylène-diphosphonate (DHMDP)	0.062 ± 0.021	1.143 ± 0.126	0.051 ± 0.027
Hydroxyéthylène - diphosphonate (HEDP)	0.052 ± 0.010	1.134 ± 0.097	0.035 ± 0.009
Ethylidène - diphosphonate (EDDP)	0.029 ± 0.008	1.261 ± 0.123.	0.016 ± 0.005
Methylène - diphosphonate (MDP)	0.043 ± 0.018	1.484 ± 0.195	0.027 ± 0.019
Monohydroxyméthylène - diphosphonate (MHMDP)	0.021 ± 0.014	2.579 ± 0.211	0.098 ± 0.20

Les résultats montrent que le monohydroxyméthylène diphosphonate MHMDP que nous avons simplement appelé HMDP, offre une amélioration bien définie pour l'imagerie du squelette.

I.4.2. - Conclusion

Les seules informations dont nous disposons concernant ces divers produits relèvent strictement du domaine médical. Dans ces conditions, il nous a paru important d'aborder l'étude de ces produits par une approche plus chimique de façon à mieux comprendre leur devenir biologique.

CHAPITRE II

II. - ANALYSE DE LA MATIERE PREMIERE

II.1. - Introduction

Nous avons vu au chapitre I.3. , que la production d'un produit radiopharmaceutique commence au niveau des matières premières et de leurs analyses.

On appelle matière première, tout ce qui entre dans la pénétration d'une trousse et qui par addition du technétium devient un produit radiopharmaceutique.

Chaque lot de matières premières nécessite un contrôle complet qui comprend la détermination de la teneur en principe actif et celle des impuretés toxiques pour l'individu.

Nous considérons ici seulement l'analyse de la matière première H.M.D.P. qui est le principe actif de cette trousse.

Les impuretés essentielles du H.M.D.P. peuvent être son produit d'oxydation le carbonyldiphosphonate C.D.P. ou son produit de réduction, le méthylène diphosphonate M.D.P.

II.2. - Caractéristiques de la matière première

Le monohydroxyméthylène diphosphonate disodique (HMDP) est testé dans sa pureté et dans son homogénéité à l'aide de différentes techniques d'analyse.

II.2.1. - L'identification

Elle nécessite deux méthodes de contrôle :

- l'une basée sur l'étude du spectre infra-rouge,
- l'autre sur l'utilisation de la chromatographie sur plaque.

II.2.1.1. - Spectre infra-rouge

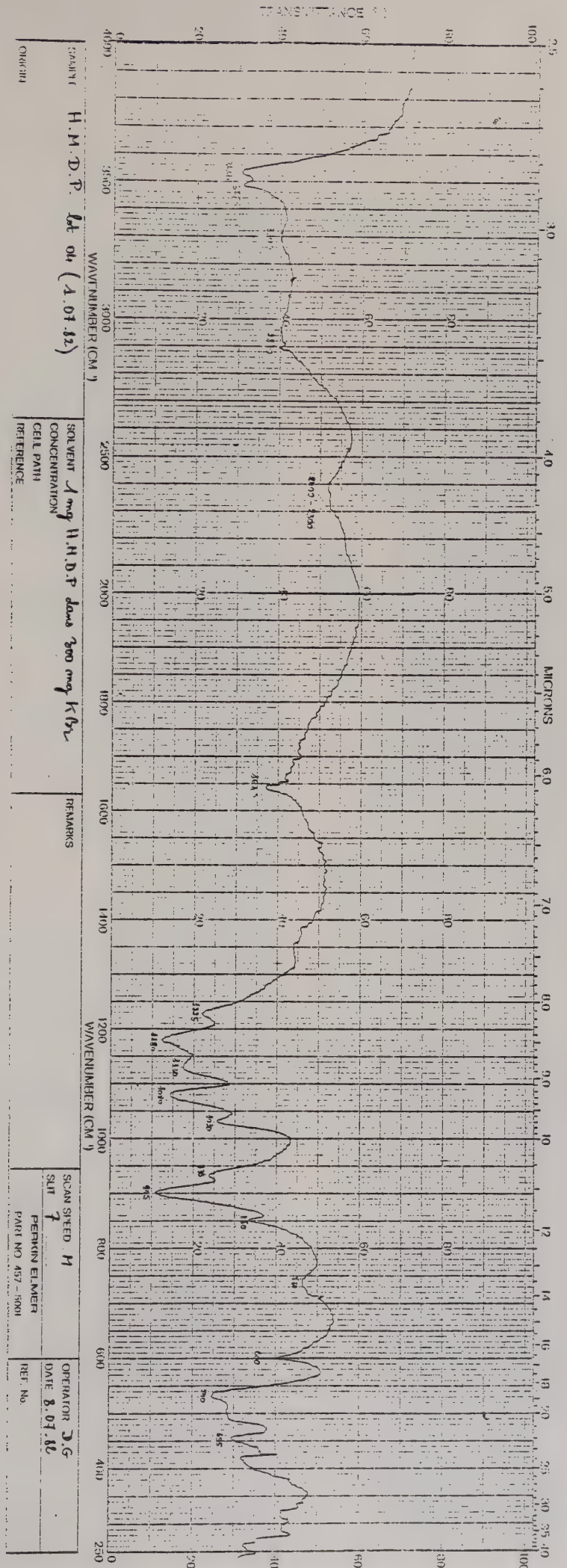
Les spectres infra-rouge d'un mg de produit comprimé avec 300 mg de KBr sous forme d'une pastille sont reproduits sur les figures 3 et 4.

Nous avons fait le spectre infra-rouge de plusieurs échantillons de HMDP provenant de différents productions et celui d'un échantillon de M.D.P.

Tout d'abord, en se basant sur l'étude de MOEDRIZTER et IRANI (1961), faite sur les spectres infra-rouge des acides mono et polyméthylène diphosphoniques et sur l'ouvrage de BELLAMY (1964), nous proposons pour le sel disodique du HMDP, les corrélations suivantes :

Le spectre du HMDP disodique correspond à celui du MDP disodique excepté l'absence des bandes à 2930 cm^{-1} 1375 cm^{-1}, et 730 cm^{-1} caractéristiques de la présence du groupe CH_2.

FIGURE 3 - SPECTRE INFRA-ROUGE DE L'HYDROXYMETHYLENE PHOSPHONATE



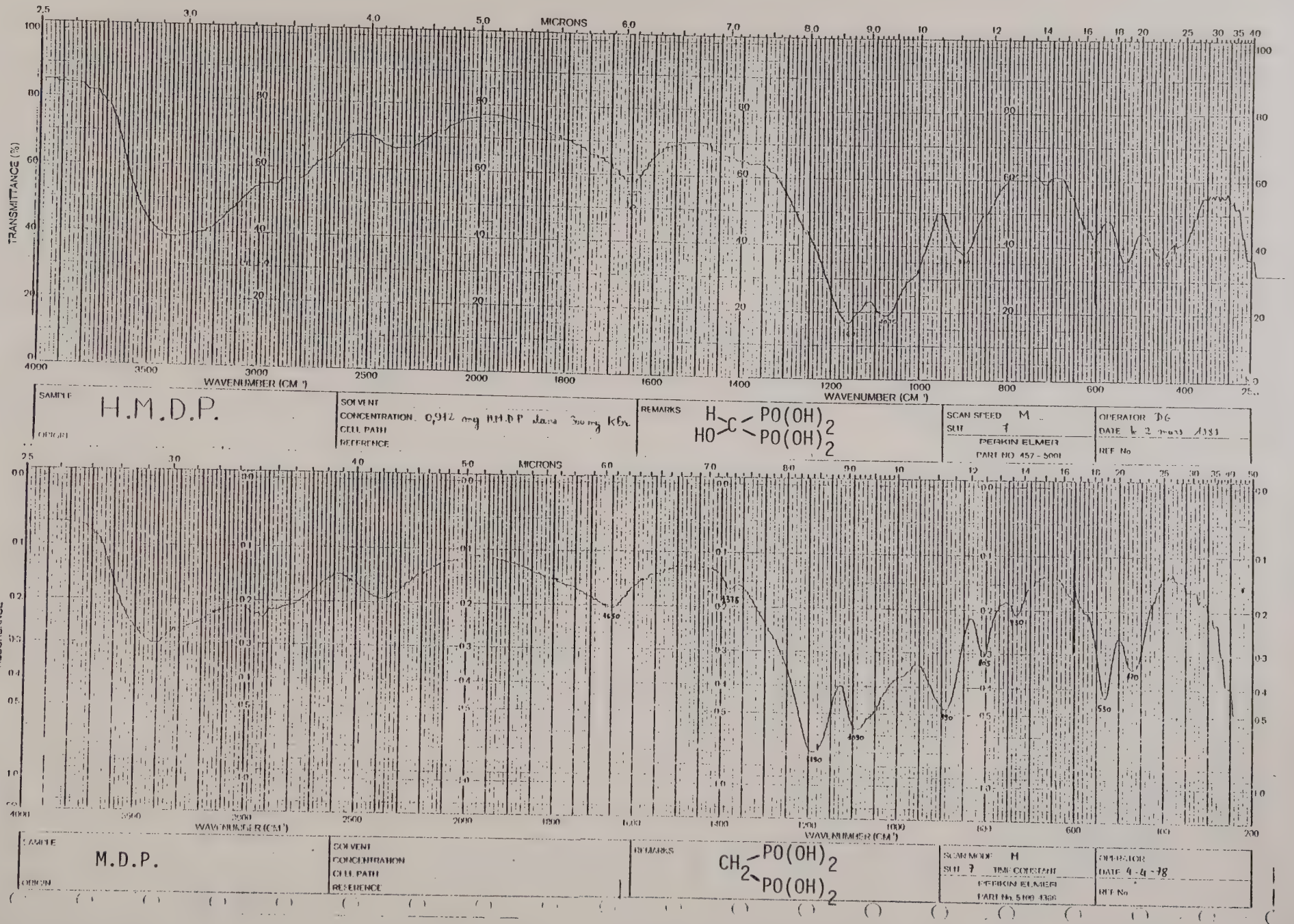


FIGURE 4 : SPECTRES INFRA-ROUGE DU HMDP ET MDP

NOMBRE D'ONDES en cm^{-1}	INTENSITE	CORRELATIONS (BELLAMY 1964 - MOEDRITZER 1961)
3540	m bande fine	OH liés liaison H intermoléculaire
3480	m bande fine	
3400 - 3300	F bande large	OH liés liaison H polymère
2900 - 2700	mf plusieurs bandes larges	P - OH valence
2400 - 2300	m bande large	P - OH (composés acide du phosphore)
1640	m bande fine	H_2O OH vibration de déformation
1225	ep bande fine	
1180	TF bande fine	P = O vibration de valence
1130	ep bande fine	
1080	TF bande fine	(D. CROSS 1967)
1030	ep bande fine	
935	ep bande fine	
905	TF bande fine	P - C - P
850	f bande fine	
730	f bande large	P - C Vibration de Valence
600	m bande fine	
540	m bande fine	
455	m bande fine	

m = moyen
f = faible
TF = très fort
ep = épaulement

Par ailleurs, la présence du groupement C - OH est mise en évidence par l'épaulement assez fort à 1010 cm^{-1}.

Le spectre du HMDP peut présenter quelques fois un nombre de bandes inférieures suivant les lots de fabrication et l'état cristallin du produit.

Néanmoins, les bandes fondamentales à 1160 - 1080 et 900 cm^{-1} ainsi que la large absorption autour de 3400 - 3300 cm^{-1} subsistent. Par contre les petites bandes d'épaulement à 1125 - 1130 - 1030 - 935 et 850 ainsi que celles à 3540 et 3480 cm^{-1} disparaissent, ce qui montre que les variations sont produites par les changements dans l'état de polymérisation du produit.

La bande à 1180 cm^{-1} qui correspond à la vibration de valence P = O, a un déplacement d'environ 80 cm^{-1} par rapport à la valeur théorique égale à 1350 - 1250 cm^{-1}. Ce déplacement est dû à la formation de ponts hydrogène entre les groupements OH provenant soit de celui du C - OH, soit de ceux du P - OH.

Il est possible que l'association produise soit des dimères (ce qui est confirmé par les bandes minces à 3540 - 3480 cm^{-1}) soit des polymères (bandes larges à 3400 - 3200 cm^{-1}).

II.2.1.2. - Chromatographie

En chromatographie sur plaque ou sur papier pour un solvant donné, l'emplacement de chaque substance est caractérisé par son Rf défini par le rapport suivant :

Rf : distance parcourue par la substance
     distance parcourue par le solvant

La chromatographie sur plaque du produit présente une tache intense à un Rf de 0,45 ± 0,1 dans les conditions opératoires suivantes :

Plaques :

Cellulose MACHEREY NAGEL ou SCHLEIGER et SCHULL

Solvant :

H_2O - Eth OH - Iso But OH - Isoprop OH acide trichloroacétique NH_4OH concentré (30 - 35 - 15 - 20 - 5 g - 0,4)

Révélateur :

Mélanger extemporanément les réactifs indiqués ci-après dans les proportions suivantes :

- 50 ml du réactif a, 10 ml du réactif b, et 2 ml du réactif c.

a) 27 g de polyvinylpyrrolidone (P.V.P) + 1 g d'azoture de sodium dans un litre d'eau distillée.

b) 3,4 g d'heptamolybdate d'ammonium, tétrahydraté dans 100 ml d'eau distillée, ajouter 65 ml d'acide sulfurique concentré et diluer à 250 ml.

c) 5 g d'o - phénylènediamine dichlorhydrate et 3,6 g de thiourée dans 50 ml d'eau distillée.
On pulvérise ce mélange sur la plaque et on laisse sécher à l'air et à température ambiante. Dans ces conditions les phosphonates donnent une coloration bleue dont l'intensité augmente avec le temps.

La chromatographie sur plaque du produit ne doit pas montrer à la révélation la présence d'autres taches ; telles que :

MDP Rf 0,6 $\pm$ 0,1

CDP Rf 0,25 $\pm$ 0,05 (le centre de la tache devient jaune)
impuretés possibles.

Une fois l'identification du produit faite, il nous faut en déterminer sa pureté.

II.2.2. - L'analyse quantitative

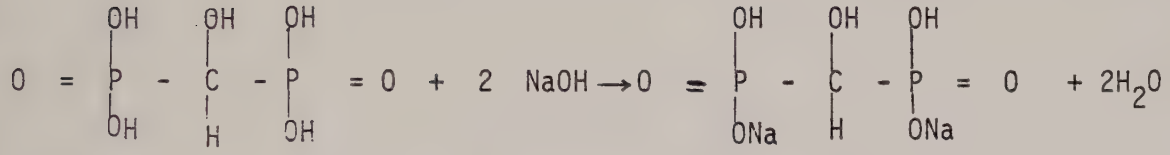
L'analyse quantitative du produit comprend la mesure du contenu en acide hydroxyméthylène diphosphonate, en sodium, en eau, en carbonyldiphosphonate de sodium et en métaux lourds.

II.2.2.1. - Contenu en acide hydroxyméthylène diphosphonate

On pèse très précisément environ 100 mg du produit et on les dissout dans un minimum d'eau distillée.

Notre produit étant disodique, on passe la solution ainsi obtenue sur une colonne de résine Dowex Bio Rad AG 50 WX8 forme H^+ (longueur de la colonne 10 cm, diamètre intérieur 1 cm) pour retenir le sodium. On recueille l'éluat dans une fiole jaugée de 25 ml, on lave plusieurs fois la résine avec de l'eau distillée de façon à remplir la fiole. On titre cette solution avec de la soude 0,1 N jusqu'au virage du bromo-crésol pourpre (5' - 5'' bromo-o-crésol sulfone phtaléine) (pH5, 2 - 6).

La réaction acido-basique mise en jeu est la suivante :



pH 5,2 - 5,8

L'analyse potentiométrique est représentée par la courbe figure 5.

Ensuite on calcule le pourcentage du HMDP contenu dans l'échantillon de la façon suivante :

$$\frac{\text{Volume NaOH utilisé x titre NaOH}}{\text{poids produit x } 0{,}0104} \times 100$$

L'ensemble des résultats montre que le contenu en acide hydroxyméthylène diphosphonique est compris entre 78 et 84 % suivant les échantillons.

II.2.2.2. - Contenu en sodium

On pèse très précisément 50 mg du produit que l'on dissout dans de l'eau distillée, on ajoute 2 ml de ISA (Ionic Strength

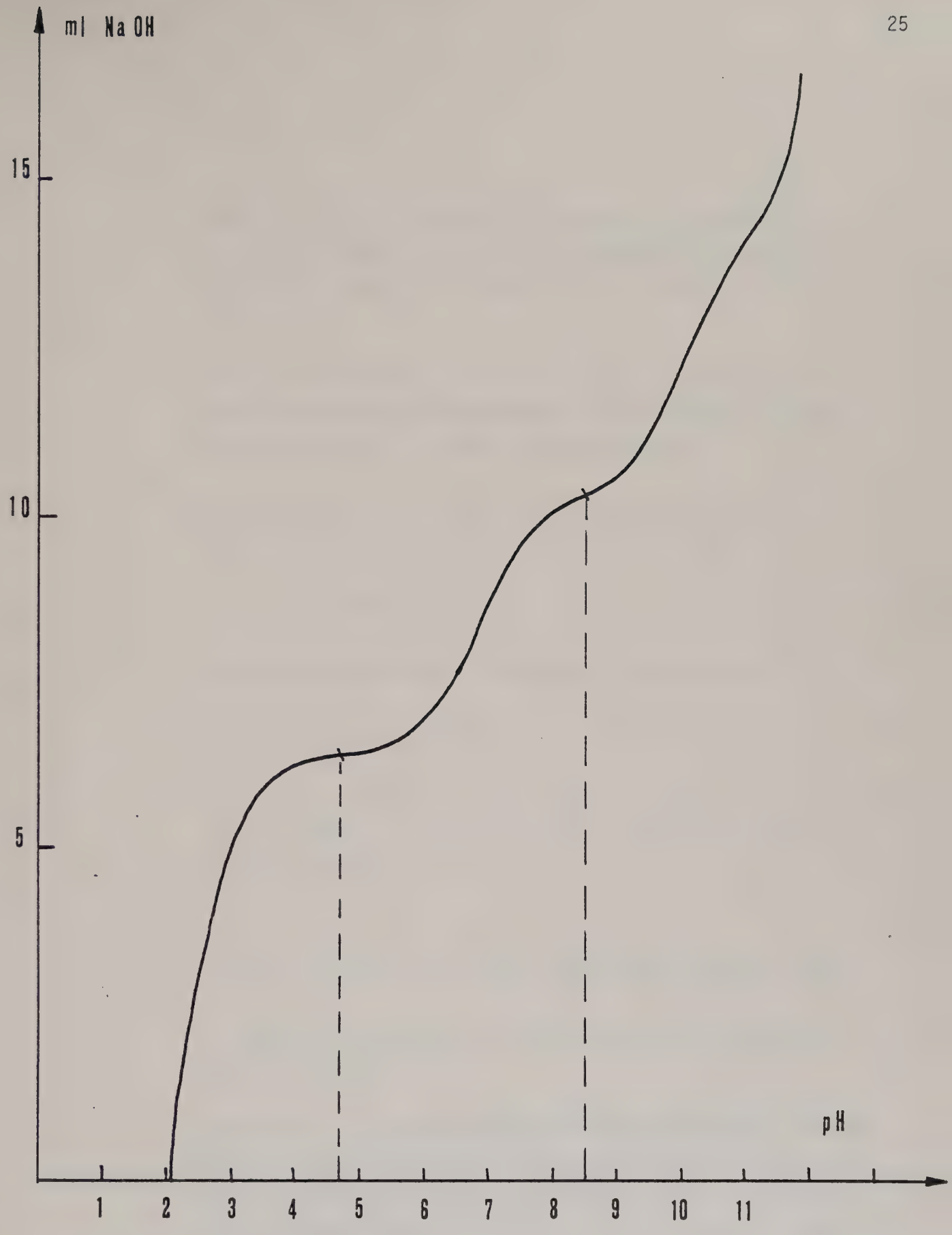


Figure 5 Courbe pH = f (volume Na OH)

Dosage du H.M.D.P.

Adjustor). (ISA : ce produit est obtenu en dissolvant 20 g de chlorure d'ammonium dans de l'eau auquel on ajoute 5 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré puis on complète à 100 ml avec de l'eau).

On mesure le contenu en sodium à l'aide d'une électrode spécifique étalonnée préalablement et d'un ensemble potentiométrique ORION 901 ionomètre à microprocesseur.

Les divers essais ont montré que le contenu en sodium est compris entre 16 et 22 % suivant les échantillons.

II.2.2.3. - Contenu en eau

Cette détermination peut s'effectuer de deux façons :

. Soit par séchage à 105° C,

. Soit par la méthode de KARL FISHER, les expériences montrent que le conteu en eau est inférieur à 2% quelle que soit la méthode utilisée.

II.2.2.4. - Contenu en carbonyldiphosphonate de sodium (CDP)

Il nécessite une méthode de contrôle basée sur l'étude du spectre visible.

On dissout 30 mg de produit dans 3 ml d'eau distillée, auxquels on ajoute quelques gouttes de soude pour ajuster le pH à 12 puis on enregistre le spectre visible de cette solution entre 500 et 350 manomètres. Le produit ne doit présenter aucune bande d'absorption autour de 420 nm (zone d'absorption du C.D.P), de plus son absorbance à cette longueur d'onde doit être inférieure à 0,005 D.O.

L'ensemble des résultats montre que le contenu en C.D.P est inférieur à 5 %. Cette limite ne devant jamais être dépassée pour des produits injectables.

II.2.2.5. - Contenu en métaux lourds

La teneur en métaux lourds est déterminée par spectrographie d'émission au CEN Fontenay aux Roses.

Les métaux lourds analysés sont : Cu, Cd, Pb, Sn, Sb et Ni parce que ce sont toxicologiquement les plus importants.

On peut noter pour le nickel qu'en plus de sa toxicité, sa recherche est nécessaire à cause de son utilisation au cours de la synthèse du produit HMDP (Ni RANEY).

Les résultats d'une analyse type, semi quantitative en ppm sont les suivants :

Cu	Cd	Pb	Sn	Sb	Ni
<10	<2	<5	<5	<10	Non décelé

Les résultats d'analyse indiquent que le contenu en métaux lourds est inférieur à 100 pp.m.

II.2.2.6. - Conclusion

Finalement, la somme des résultats d'analyse des produits est très peu différente de 100 %, à savoir :

. Contenu en HMDP - CDP - MDP : 78 - 84 %
. Contenu en sodium : 22 - 16 %
. Contenu en eau inférieur à : 2 %

Le bilan de l'analyse de la matière première est compris entre 100 et 102 %.

CHAPITRE III

III. - ANALYSE DES COMPOSES DE LA TROUSSE

L'analyse de la matière première étant faite, nous avons dans un deuxième temps effectué la préparation de la "trousse" ainsi que son analyse.

On appelle trousse un conditionnement de produit comprenant un agent complexant, un réducteur, un conservateur et un régulateur de pH sous atmosphère inerte, le mélange étant lyophilisé de sorte que par simple addition de pertechnétate ^{99m}Tc et agitation, le produit radiopharmaceutique ainsi préparé puisse être utilisé.

III.1. - Préparation de la trousse

Nous avons effectué la préparation de la trousse d'hydroxyméthylène diphophonate en mélangeant d'abord la solution du H.M.D.P. (molécule vectrice), à celle de chlorure d'étain $Sn\ Cl_2,\ 2\ H_2O$ (le réducteur) et à celle de l'acide ascorbique (agent anti-oxydant), puis ensuite on ajuste le pH avec de l'hydroxyde de sodium.

Toutes ces solutions sont préparées avec de l'eau pour préparation injectable désaérée et toutes les opérations sont réalisées sous atmosphère inerte (azote ou argon) afin d'éviter l'oxydation du chlorure stanneux.

Après filtration par passage au travers d'une unité de filtration stérile de 0,22µm au cours de laquelle on répartit en flacon type pénicilline de 10 ml, on lyophilise.

Chacun de ces composants doit être dosé pour s'assurer que la répartition et la lyophilisation ont été réalisées dans de bonnes conditions.

III.2. - Analyse des constituants de la trousse

III.2.1. - Détermination du contenu en H.M.D.P

La méthode d'analyse décrite au chapitre II.2.2.1. par tritation ne peut être appliquée pour la détermination du contenu en H.M.D.P dans la trousse pour la simple raison que la quantité du H.M.D.P présente dans celle-ci est égale à 2 mg. Il nous a fallu trouver une méthode plus sensible et nous avons finalement utilisé une méthode colorimétrique.

II.2.1.2. - Principe

Plusieurs méthodes colorimétriques pour la détermination des phosphates sont basées sur la formation de l'acide 12 - molybdophosphorique jaune (12 - MPA) à partir de phosphate et de molybdate (Mo (VI)). Le 12 - MPA est ensuite transformé en bleu de phosphomobybdate (PMB) ou bleu de molybdène par un réducteur en milieu acide.

La méthode que nous avons employée pour la détermination des phosphonates s'inspire de celle mise au point par L.G MORIN (1973), et P.C BARTELS (1975), qui utilise le polyvinylpyrrolidone (PVP) et l'o-phénylènediamine (O.P.D).

L'o-PD est le réducteur, le PVP ne joue pas seulement le rôle du préservateur du colloïde de bleu de molybdène mais intervient dans la réaction et le mécanisme de la réaction dépend la quantité du P.V.P.

$$(-PO_3H_2) + Mo\ (VI) + P.V.P \rightleftharpoons 12 - MPA + H^+$$

et

$$12 - MPA + PVP + o\text{-}P.D \rightleftharpoons PMB + Ox$$

La réaction globale est :

$$x\ (-PO_3H_2) + y\ Mo\ (VI) + p\ P.V.P. + OPD \rightleftharpoons PMB + z\ H^+ + Ox$$

Le bleu de molybdène (anion et acide insoluble) ne se forment quantitativement que dans des conditions critiques d'acidité.

En milieu moins acide, il disparait au profit d'autres composés plus riches en molybdène, en milieu plus acide il se détruit, d'après ce que nous savons de la constitution des solutions Mo (VI) et Mo (V), les équilibres peuvent s'écrire :

$$2\ H_2\left[\begin{matrix}Mo_4^{VI}\\ Mo_2^{V}\end{matrix}\ O_{18}\right] + 4\ H^+ \longrightarrow Mo_4^{V}\ O_8^{4+} + 2\ H_2\ Mo_4^{VI}\ O_{13}$$

Le bleu de molybdène est intermédiaire entre Mo (VI) et Mo (V), sa formule empirique a été couramment transcrite sous la forme $Mo_n\ O_{3n-1},\ x\ H_2O$ où n peut être n'importe quelle valeur supérieure à 2. On le trouve fréquemment écrit P (V) - Mo (V) - Mo (VI).

HEIN, BURAWOY et SCHWEDLER (1936) suggèrent que la formation des produits bleus réduits de phosphomolybdates peut s'expliquer par la formation de ponts oxygène par perte d'atomes d'oxygène entre des tétraèdres molybdène oxygène voisins.

. Solution réductrice

Peser 5 g de dichlorhydrate d'o-phénylènediamine et 3,6 de thiourée et les dissoudre dans 50 ml d'eau distillée. La solution doit être incolore ou légèrement rosée. Dans le cas contraire, le dichlorhydrate d'o-phénylènediamine s'est altéré.

. Solution de travail

Mélanger 50 ml de solution catalytique, 10 ml de solution acide de molybdate et 2 ml de solution réductrice. Cette solution doit être utilisée dans les deux heures qui suivent la préparation.

III.2.1.2.2. - Mode opératoire

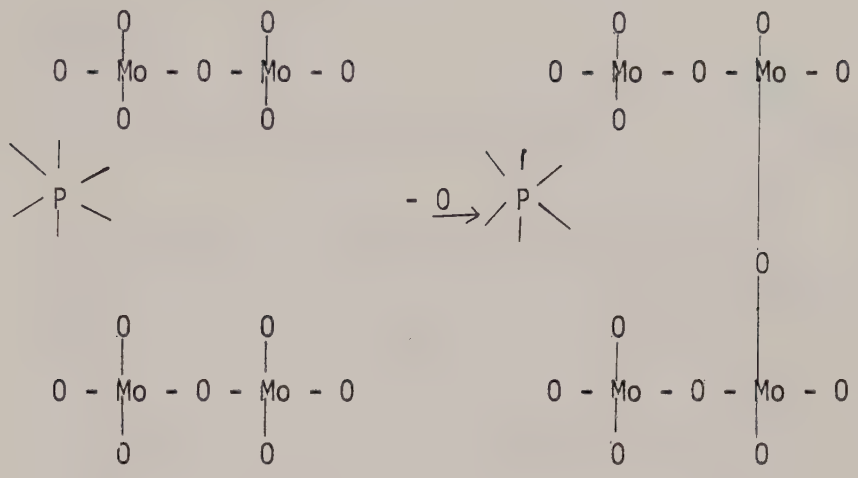
On introduit les échantillons dans des fioles jaugées de 10 ml, on ajoute 8 ml de la solution de travail et on complète à 10 ml avec de l'eau distillée.

On mesure l'absorbance à 725 nm par rapport à un blanc.

III.2.1.2.3. - Etalonnage

On dissout 20 mg d'H.M.D.P. sel disodique dans 10 ml d'eau distillée. On prélève 40, 50, 60, 70 et 80 µl de cette solution et on procède comme indiqué dans le mode opératoire.

On calcule le coefficient de régression linéraire et l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage.



III.2.1.2. - Protocole expérimental

III.2.1.2.1 - Réactifs

La préparation des différents réactifs est réalisée suivants la procédure indiquée ci-dessous :

. Solution catalytique

Peser 27 g de polyvinylpyrrolidone (PVP) et 1 g d'azoture de sodium et les dissoudre dans 1 litre d'eau distillée.

. Solution acide de molybdate

Peser 3,4 g d'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté et les dissoudre dans 100 ml d'eau distillée. Ajouter 65 ml d'acide sulfurique concentré. Bien agiter et les diluer à 250 ml avec de l'eau distillée.

III.2.1.3. - Résultats

III.2.1.3.1. - Dosage du HMDP seul

On a été amené à produire artificiellement une trousse dans laquelle se trouve uniquement l'agent complexant dans les proportions de la trousse.

Les essais ont été réalisés suivant le protocole précédemment énoncé et ont donné les résultats suivants :

mg HMDP	ABSORBANCE APRES 1 HEURE	ABSORBANCE APRES 3 HEURES
0,4	0,210	0,356
0,8	0,390	0,650
1,2	0,478	0,890
1,6	0,690	1,090
2	0,835	1,254

Dès ces premiers essais, on note l'augmentation de l'absorbance en fonction du temps.

Le temps de trois heures pouvant être considéré comme étant celui pour lequel la réaction est à l'équilibre.

Pour des temps beaucoup plus longs, par exemple 16 heures, le P.V.P ne joue plus son rôle de préservateur et le colloïde de bleu de molybdène n'est plus en suspension.

III.2.1.3.2. - Dosage du HMDP en présence d'acide ascorbique

L'étain stanneux et l'acide ascorbique présents dans le milieu sont aussi des réducteurs, ils interfèrent donc sur l'intensité de la coloration et sur la vitesse de la réaction.

On peut le voir dans le tableau III regroupant les résultats obtenus avec ou sans addition d'acide ascorbique (A.A) :

Tableau III - Absorbance de la solution après une heure avec ou sans addition d'acide ascorbique

mg H.M.D.P	SANS ACIDE ASCORBIQUE	AVEC ACIDE ASCORBIQUE
0,4	0,210	0,310
0,8	0,390	0,546
1,2	0,478	0,750
1,6	0,690	0,945
2	0,835	1,090

A cause de ces interférences, la mesure doit être effectuée soit après oxydation à l'air de l'étain stanneux et de l'acide ascorbique soit après leur addition dans les solutions d'étalonnage dans l'ordre de préparation de la trousse.

De nombreux essais ont été réalisés en fonction du temps de réaction avec les deux méthodes, la méthode d'oxydation et celle des ajouts d'étain stanneux et d'acide ascorbique.

III.2.1.3.5. - Conclusion

Les deux méthodes ont donné la même précision :

± 2,1 % pour la méthode par oxydation et

± 1,8 % pour la méthode des ajouts

En fait, à cause de la sensibilité élevée et de la variation de la coloration en fonction du temps, la source d'erreur la plus importante est la variation du temps d'attente entre les étalons et les échantillons, rendue plus critique, dans le cas de la méthode des ajouts, par la différence de vitesse de réaction entre les étalons et les échantillons, que dans le cas de la méthode par oxydation.

Le choix se fixe donc sur la méthode d'oxydation.

La loi de Beer est suivie dans le domaine des concentrations considérées.

La reproductibilité obtenue par la mesure de cinq prélèvements identiques d'une solution artificielle de HMDP - Sn Cl_2, $2H_2O$ - acide ascorbique est de 0,9 %.

La sensibilité est assez élevée car on obtient dans les conditions opératoires indiquées, une absorbance de 0,009 par µg de HMDP, ce qui correspond à un coefficient d'extinction molaire de $16,5 \times 10^3$.

$Abs = \varepsilon 1 c$ ε : Coefficient d'extinction molaire

1 : épaisseur de la cuve

c : concentration en atome gramme de l'élément ou produit à doser.

III.2.1.3.3. - Dosage par la méthode d'oxydation

Afin d'oxyder l'étain stanneux et l'acide ascorbique on dissout le contenu de chaque flacon dans quelques ml d'eau distillée et on laisse à l'air pendant un minimum de 48 heures.

On introduit ensuite cette solution dans une fiole jaugée de 10 ml et on complète avec de l'eau distillée. Pour analyser cet échantillon, on répartit 0,6 ml de cette solution dans chaque fiole de 10 ml puis on procède comme indiqué dans le mode opératoire.

La coloration initiale est faible pour toutes les fioles y compris celles de l'étalonnage.

Nous avons regroupé les résultats dans le tableau IV.

Tableau IV - Absorbance du bleu de molybdèn e en fonction du temps dans la méthode d'oxydation

mg HMDP	ABSORBANCE APRES				
	30 mn	1 h	1h 30	2 h	2 h 30
80	0,112	0,218	0,338	0,448	0,539
100	0,138	0,266	0,408	0,538	0,645
120	0,165	0,312	0,478	0,624	0,752
140	0,195	0,362	0,550	0,716	0,850
160	0,224	0,412	0,625	0,806	0,940
Coefficient de corrélation	0,9996	0,999	0,9999	1,000	0,9994
Echantillon 03	0,218	0,368	0,532	0,668	0,806
	0,218	0,366	0,528	0,668	0,806
	0,218	0,364	0,529	0,669	0,806
Echantillon 05	0,218	0,366	0,530	0,667	0,795
	0,228	0,368	0,530	0,667	0,800
	0,226	0,365	0,527	0,665	0,790

(le coefficient d'extinction molaire est calculé par rapport aux moles de produit à doser et non pas aux moles de complexe mesuré pour faciliter la comparaison entre la sensibilité des mesures des différents produits (IUPAC 1963)).

L'influence du temps de réaction nous amène à fixer un temps de repos de trois heures avant de mesurer l'absorbance

III.2.2. - Détermination des contenus en étain stanneux et en acide ascorbique de la trousse

III.2.2.1. - Principe

Le dosage de l'étain stanneux et celui de l'acide ascorbique sont obtenus par la réaction colorimétrique avec la cacothéline (SNELL 1955).

La cacothéline est un dérivé de la brucine (nitrobucine). Dans les deux dosages, la cacothéline sous forme quinone est réduite à la forme hydroquinone de formule

$C_{21}\ H_{23}\ O_7\ N_3$ fortement colorée en violet (GALLO 1967).

L'acide ascorbique est oxydé en acide déhydroascorbique.

. Pour le dosage de l'étain stanneux, l'acide ascorbique présent dans la préparation interfère mais sa vitesse de réaction est très lente (environ 20 minutes) tandis que la réaction avec l'étain stanneux est très rapide, de plus la coloration disparait dans le temps.

Pour ces raisons , la lecture doit être effectuée dans les quelques secondes qui suivent l'addition des réactifs.

L'acide ascorbique n'a donc aucune influence sur les mesures de l'étain stanneux de même l'hydroxyméthylène diphosphonate n'interfère pas.

. Pour le dosage de l'acide ascorbique l'étain stanneux et l'hydroxyméthylène diphosphonate interfèrent sur la mesure en augmentant l'intensité de la coloration, (la disparition de la coloration obtenue par la réaction avec l'étain stanneux n'est pas complète après 20 minutes).

Pour ces raisons, nous avons été amenés à utiliser la méthode des ajouts (HMDP - $Sn\ Cl_2$, 2 H_2O) dans les solutions étalons, dans les proportions et dans l'ordre indiqués dans la préparation de la trousse.

III.2.2.1.1. - Dosage de l'étain stanneux

III.2.2.1.1.1. - Protocole expérimental

a) Réactifs :

. Cacothéline : on prépare extemporanément une solution à 0,25 % dans de l'eau désaérée sous argon.

. Acide chlorhydrique à 10 % : On verse 20 ml d'acide chlorhydrique concentré et on dilue à 200 ml avec de l'eau désaérée sous argon.

b) Mode opératoire :

On introduit dans une fiole jaugée de 10 ml, 1 ml de cacothéline. On ajoute l'échantillon et on complète avec de l'acide chlorhydrique à 10 %.

On mesure l'absorbance à 525 nm par rapport à un blanc. On effectue la mesure très rapidement après l'addition de l'échantillon.

c) Etalonnage :

On pèse 50 mg de Sn Cl_2, $2H_2O$ et on les dissout dans 50 ml d'acide chlorhydrique à 10 %.
On prélève 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 et 0,5 ml de cette solution et on procède comme indiqué au mode opératoire.

On calcule le coefficient de régression linéaire et l'ordonnée à l'origine. L'étalonnage doit êre effectué immédiatement après la dissolution du chlorure stanneux dans l'acide chlorhydrique car l'ion stanneux s'oxyde très rapidement en solution aérée.

d) Mesures :

On dissout le contenu d'un flacon dans quelques ml d'acide chlorhydrique à 10 %, on introduit la totalité de la solution dans une fiole jaugée de 10 ml contenant 1 ml de cacothéline puis on procède comme indiqué au mode opératoire.

III.2.2.1.1.2. - Résultats

Les résultats sont regroupés dans le tableau VI

Tableau VI : Analyse spectrophotométrique de l'étain stanneux

$\mu g SnCl_2,2H_2O$	$\mu g\ Sn^{2+}$	ABSORBANCE A 525 nm/blanc	SENSIBILITE Abs/$\mu g\ Sn^{2+}$
90	47	0,045	0,0010
180	95	0,135	0,0014
270	142	0,235	0,0017
360	189	0,338	0,0018
450	236	0,464	0,0020
Coefficient de corrélation		0,998	
Echantillon 05		0,275	
		0,280	
		0,275	

0,0016 ± 0,0004

III.2.2.1.1.3. - Conclusion

La loi de Beer est suivie pour des concentrations allant de 0,04 10^{-3} M jusqu'à 0,33 10^{-3}M.

La reproductibilité de la mesure est de 0,7 % (calculée à partir de mesures effectuées sur cinq prélèvements identiques d'une solution artificielle du produit).

La sensibilité est de 0,0016 D.O par µg d'étain stanneux ce qui correspond à un coefficient d'extinction molaire de 2,8.10^{3} (le coefficient d'extinction molaire est

calculé par rapport aux moles de produit à doser et non pas aux moles de complexe mesuré ceci pour faciliter la comparaison entre la sensibilité des mesures des différents produits), (I.U.P.A.C 1963).
La précision de la mesure est de ± 1%.

III.2.2.1.2. - Dosage de l'acide ascorbique

III.2.2.1.2.1. - Protocole expérimental

a) Réactifs

. Solution de chlorure stanneux : on dissout 30 mg de $Sn\ Cl_2,\ 2\ H_2O$ dans 100 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N.

. Solution de HMDP : on dissout 20 mg d'HMDP dans 10 ml d'eau distillée.

. Cacothéline : on prépare une solution à 0,157 % dans de l'eau distillée et on la laisse reposer au minimum 48 h. (On améliore la sensibilité de la mesure par le vieillissement de la solution).

. acide chlorhydrique 0,1 N

b) Mode opératoire

On introduit les échantillons dans des fioles jaugées de 10 ml. On ajoute 5 ml de la solution de cacothéline et on complète à 10 ml avec de l'eau distillée.
On laisse reposer 20 minutes et on mesure l'absorbance à 525 nm par rapport à un blanc.

c) Etalonnage

On pèse très précisément une quantité d'acide ascorbique aux environs de 35 mg et on les dissout dans 1 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N, on complète à 100 ml avec de l'eau distillée.

On introduit dans des fioles de 10 ml, les réactifs dans l'ordre suivant :

. 0,05 ml de la solution d'HMDP,
. 0,5 ml de la solution de chlorure stanneux
. et pour chaque fiole soit : 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,8 ou 0,9 ml de la solution étalon d'acide ascorbique.

On procède ensuite comme indiqué au mode opératoire et on calcule le coefficient de régression linéaire et l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage.

d) Mesures

On dissout le contenu d'un flacon dans 1 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N et on prélève 0,5 ml de cette solution qu'on introduit dans une fiole de 10 ml.

On procède ensuite comme indiqué au mode opératoire.

III.2.2.1.2.2. - Conclusions

La reproductibilité obtenue par la mesure de plusieurs échantillons artificiels est de 0,9 %.

La sensibilité dans les conditions opératoires indiquées est de 0,0008 D.O par µg d'acide ascorbique ce qui

correspond à un coefficient d'extinction molaire de $1.4.10^{-3}$.
La loi de Beer est suivie pour des solutions de concentration comprise entre 0,8 et $3,3.\ 10^{-3}$ M.
La précision de la mesure est égale à 1,2 %.
A cette dernière détermination, les constituants de la trousse ont tous été dosés.
Elle peut être marquée par addition de pertechnétate-^{99m}Tc et devenir ainsi une paréparation radiopharmaceutique dont nous devons mesurer le rendement de marquage.

III.3. - Le rendement de marquage

Le rendement de marquage c'est-à-dire le taux de complexation du technétium avec la molécule vectrice (HMPD) est déterminé par chromatographie :

- Sur papier
- Sur I.T.L.C (Instant Thin Layer Chromatography)

Pour chacune de ces méthodes, les conditions expérimentales utilisées sont décrites ci-dessous :

- Méthode sur papier

. Phase mobile : méthanol - eau (80-20) ou acétone.

. Phase stationnaire : papier Wathman 1

Le H.M.D.P marqué au ^{99m} Tc a un Rf égal à zéro avec les deux solvants alors que le pertechnétate a un Rf voisin de 0,6 avec le solvant méthanol-eau et 0,9-1 avec l'acétone.

- Méthode sur I.T.L.C

. Phase mobile : Na Cl à 9 ‰

. Phase stationnaire : I.T.L.C SG (Silica Gel sur fibres de verre).

Le pertechnétate et le complexe H.M.D.P - Sn - Tc migrent au fond du solvant tandis que le technétium réduit et hydrolysé reste à la base.

Le rendement de marquage est donné par le rapport entre l'activité de la tache où se trouve le complexe et l'activité totale de la bande.

L'ensemble des résultats chapitre IV.4.2 du tableau VII montre que le rendement de marquage est compris entre 95 et 100 %.

CHAPITRE IV

IV . - ETUDE DES COMPLEXES

L'importance de la fixation osseuse du traceur relève de l'adsorption en surface au niveau de la couche hydratée de l'hydroxyapatite, des réactions d'échanges ioniques et de la diffusion intra-osseuse (R. PEREZ 1983) , c'est pourquoi, il nous a paru nécessaire de déterminer la charge du complexe H.M.D.P. qui semble jouer un rôle essentiel dans la fixation du produit.

IV.1. - Méthodes et techniques expérimentales

IV.1.1. - Charges des complexes : méthodes des résines

IV.1.1.1. - Principe

Entre une phase aqueuse contenant des ions complexes et une résine (M Cl) un échange d'ions complexes (C^{x-}) et d'anions chlorure se réalise selon l'équilibre :

$$x\ M\ Cl \ + \ C^{x} \rightleftharpoons x\ Cl^{-} \ + \ Mx\ C$$

caractérisé par la constante K' reliée à la constante d'équilibre K_{eq} par la formule :

$$\frac{1}{K_{eq}} = K' = \frac{\left[M\ Cl\right]^{x} \times \left[C^{x-}\right]}{\left[Cl^{-}\right]^{x} \times \left[Mx\ C\right]}$$

En utilisant pour chaque expérience le même poids de résine et le même volume de solution, on peut écrire pour un élément à l'échelle des indicateurs puisqu'il n'y a pas consommation de réactif macroscopique :

$$\frac{\left[C^{x-}\right]}{\left[MxC\right]} = K' \left[Cl^-\right]^x$$

$$\text{Soit : } -\log D = \log \frac{\left[C^{x-}\right]}{\left[MxC\right]} = \log K' + x \log \left[Cl^-\right]$$

Les courbes log D en fonction du log (Cl^-) nous donnent donc la valeur de x, c'est-à-dire la charge de l'entité qui se trouve fixée sur la résine.

IV.1.1.2. - Conditionnement et choix de la résine

Les résines sont des composés synthétiques de hauts poids moléculaires qui ont la propriété d'échanger des cations ou des anions. Le squelette des résines est élastique, l'eau s'insère dans les cavités ce qui les fait augmenter de volume : chaque échangeur retient le même nombre d'équivalents quel que soit l'ion échangé : c'est la capacité d'échange $\mathcal{C}e$ de l'ordre de quelques milliéquivalents par gramme de résine séchée à l'air ($\mathcal{C}e \sim 3$ à 4 meq/g). Elle est quasi indépendante de la taille des grains évalués en mesh.

On travaille commodément avec des résines de 50 - 100 mesh $\mathcal{C}e$ est obtenue en traitant une masse donnée de résine RH par une solution saline en excès et en mesurant (H^+).

Le facteur de gonflement est :

$$\delta = \frac{\text{Volume final}}{\text{Volume initial}}$$

Nous avons utilisé de la résine anionique AG 1X8 (Cl^-) 50 - 100 mesh que nous avons lavée avec NaCl 9‰ de façon à ce que la résine soit à l'équilibre puis nous l'avons lavée avec de l'eau distillée jusqu'à obtention d'une valeur de pH du surnageant identique à celle de l'eau.

Nous avons laissé sécher la résine ainsi saturée à température ambiante à l'air.

Nous avons utilisé des solutions de NaCl de concentration allant de 0,1 M à 1 M.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous :

NaCl	Poids Résine	Poids NaCl	Poids éluat	$\delta = \frac{\text{Poids éluat}}{\text{Poids NaCl}}$
0,1 M	0,2057 g	2,0209 g	1,8570	0,9189
0,2 M	0,2062 g	2,0346 g	1,8445	0,9066
0,3 M	0,1938 g	2,0449 g	1,8537	0,9065
0,4 M	0,1887 g	2,0504 g	1,8302	0,8926
1 M	0,1947 g	2,0964 g	1,9392	0,9250

On remarque que pour un poids moyen de 0,198 ± 0,008 g de résine, la valeur de δ en moyenne est égale à 0,91 ± 0,01

En pratique, si V est le volume (pour nous l'activité) initial de la solution et m la masse de résine sèche, on définit :

$$Kd = \frac{V}{m} \left(\frac{Ai}{Ae} - 5\right)$$

ou
Ai = activité initiale
Ae = activité à l'équilibre
5 = facteur de gonflement
} de la solution aqueuse

On exprime ainsi le coefficient de distribution par la formule :

$$D = \frac{Ai}{Ae} - 1$$

IV.1.1.3. - Mode opératoire

Pour déterminer la charge de notre complexe, nous avons utilisé la méthode d'échange d'ions entre une résine anionique sous forme d'ions chlorure Cl^- et des solutions de chlorure de sodium de concentration variable.

Dans des seringues de 5 ml munies d'un fritté, on agite pendant 20 minutes, 25 mg de résine AG 1 X 8 sous forme Cl^- 50 - 100 mesh avec 0,9 ml de solution de NaCl dont la concentration en chlorure varie et 0,1 ml de solution de complexes à base de H.M.D.P.

On mesure la quantité de complexe dans la solution avant passage sur colonne et dans l'éluat.

Pour l'étalonnage de la résine, nous avons utilisé l'ion pertechnétate qui a une charge - 1.

IV.1.1.4. - Vérification de la méthode par la mesure de la charge de l'ion Tc O_4^-

La validité de la méthode est confirmée à l'aide d'un ion de charge connue Tc O_4^-.

Les courbes log D = f (log(NaCl)) sont des droites de pente approximative - 1 pour le pertechnétate de sodium (figure 6).

IV.1.1.5. - Mesure de la charge du H.M.D.P seul

a) Protocole

On utilise 0,9 ml de solutions de NaCl de 0 à 0,55 M auquel on ajoute 0,1 ml de solution HMDP à 1 mg/ml. Après équilibre sur la colonne de résine anionique, on élue et on mesure la charge du HMDP seul en dosant les phosphonates de chaque éluat par la méthode décrite au chapitre III.2.1.2.

b) Résultats :

(Na Cl)	log (NaCl)	D.O.	(HMDP) f	$\frac{(HMPD)\ i}{(HMDP)\ f} - 1$	log D
0	-	0,010			
0,05	- 1,3	0,266	21,56	3,64	0,56
0,1	- 1	0,472	49,39	1,02	0,01
0,15	- 0,82	0,664	75,35	0,33	- 0,48
0,2	- 0,7	0,705	80,88	0,24	- 0,63
0,25	- 0,6	0,710	81,55	0,27	
0,3	- 0,523	0,719	82,77		
0,35		0,736			
0,4		0,740			
0,45		0,732			
0,5		0,748			
0,55		0,752			

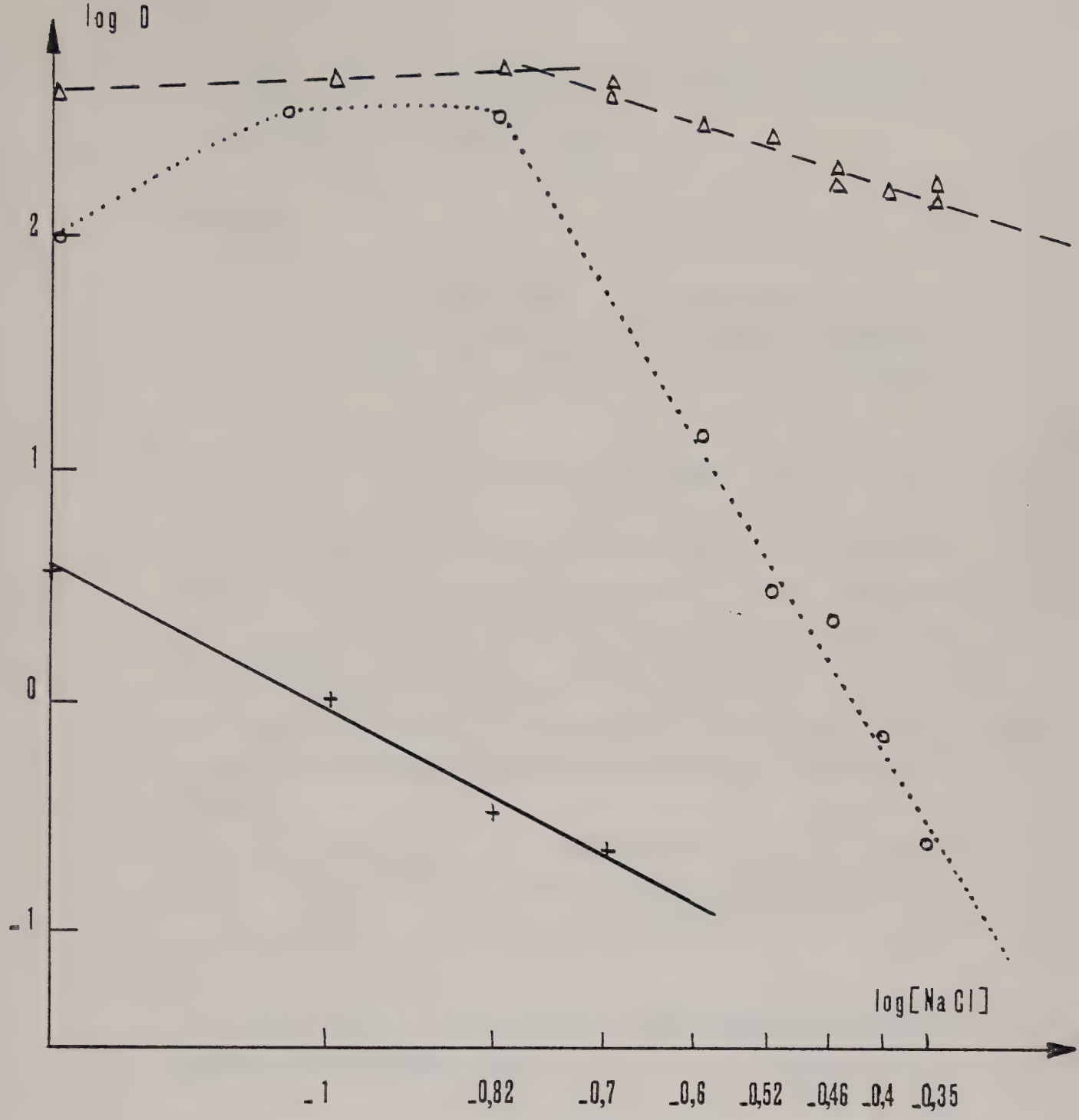


Figure 6 Courbes log D = f (log[Na Cl])

\+ du sel H.M.D.P.

Δ de l'ion TcO_4^-

o du complexe H.M.D.P. / Sn / Tc

La courbe log D = f (log [NaCl]) est une droite de pente -2,05 que nous avons tracée figure 6.
(coefficient de corrélation 0,995).

c) Conclusion

L'hydroxyméthylène diphosphonate a une charge égale à - 2. Effectivement la matière première est disodique. Cette mesure de la charge du H.M.D.P. seul peut également être une validation de la méthode.

IV.1.1.6. - Mesure de la charge du complexe HMDP - Sn

Après avoir obtenu la charge du sel HMDP égale à -2, nous avons cherché à déterminer celle du complexe HMDP - Sn. Un moyen consiste à utiliser de l'étain radioactif de façon à marquer le complexe, nous avons employé de l'étain ^{117m}Sn provenant de l'irradiation de l'étain ^{116}Sn enrichi et l'étain ^{113}Sn provenant de l'irradiation de l'étain ^{112}Sn enrichi , les résultats se sont révélés inexploitables à cause de la présence d'impuretés chimiques dans les produits enrichis.
Nous avons essayé de refaire l'expérience avec de l'étain naturel en feuille chimiquement pur mais cette fois après irradiation, c'est la présence d'impuretés radionucléidiques (plusieurs isotopes de l'antimoine) qui a faussé les résultats.

Il ne nous a donc pas été permis par cette méthode de mesurer la charge du complexe HMDP - Sn.

IV.1.1.7. - Mesure de la charge du complexe HMDP - Sn - Tc

Le but initial de la manipulation était de mesurer la charge du complexe HMDP - Sn - Tc en double marquage : c'est-à-dire avec l'étain radioactif (IV.1.1.6) et le technétium 99m , ces deux radioéléments ayant des périodes différentes . Pour les

moyenne des différents complexes en équilibre. Par souci de simplification, nous donnons au complexe HMDP - Sn - Tc une charge -7 pour la formulation précédemment donnée donc le complexe est plus chargé que l'HMDP seul. Il reste à démontrer à quel stade se fait ce complexe et à quel élément est due cette charge élevée.

IV.1.1.7. - Mesure de la charge du complexe HMDP - Sn - Tc entraineur

Pour savoir si la quantité de technétium a une influence sur la charge du complexe, on a mesuré la charge de celui-ci en présence d'une quantité de Tc O_4^- pondérable inactif connue et égale à 3 µg en plus du technétium 99 m

. Résultat

La charge du complexe n'a pas varié, nous avons obtenu pour la fonction log D = f (log (NaCl)), la valeur de la pente :

- 7,3

Coefficient de corrélation : 0,998

. Conclusion

La quantité de technétium présent dans la solution ne fait pas varier la charge du complexe.

VI.1.1.8. - Mesure de la charge du complexe HMDP - Sn - Acide ascorbique - Tc

Il reste à savoir si l'acide ascorbique entre dans la formation du complexe et si son apport modifie la charge du complexe ainsi formé.

raisons décrites au paragraphe précédent, seule l'utilisation du simple marquage avec le technétium 99 m a été possible.

Toutes les mesures du technétium sont effectuées à l'aide d'un cristal puits Na I (T1). La limite supérieure d'enregistrement d'impulsions de l'appareil est de 10^6 coups par minute, ce qui correspond à une activité réelle de 0,5 µCi et correspond à une quantité très faible de ^{99m} Tc.

Le complexe H.M.D.P - Sn - Tc a pour formulation :

H.M.D.P disodique	2 mg
$SnCl_2$ $2H_2O$	0,3 mg
^{99m}Tc	300 µCi

dans un volume total de 2 ml à pH 5 - 7. Les résultats de ces essais ont donné les courbes log D = f (log (NaCl). Ce sont des droites de pente approximative - 7.

La figure 6 montre l'allure des courbes du sel de HMDP en milieu aqueux, de l'ion TcO_4^- et du complexe H.M.D.P. - Sn - Tc.

Ordre de grandeur de quelques valeurs :

H.M.D.P - Sn - ^{99m} Tc	Pente	Coefficient de corrélation
	- 7,1	0,9982
	- 7,7	0,9998
	- 6,6	0,9800

La charge donnée par cette méthode ne représente sans doute pas la charge réelle du complexe étudié mais plutôt la valeur

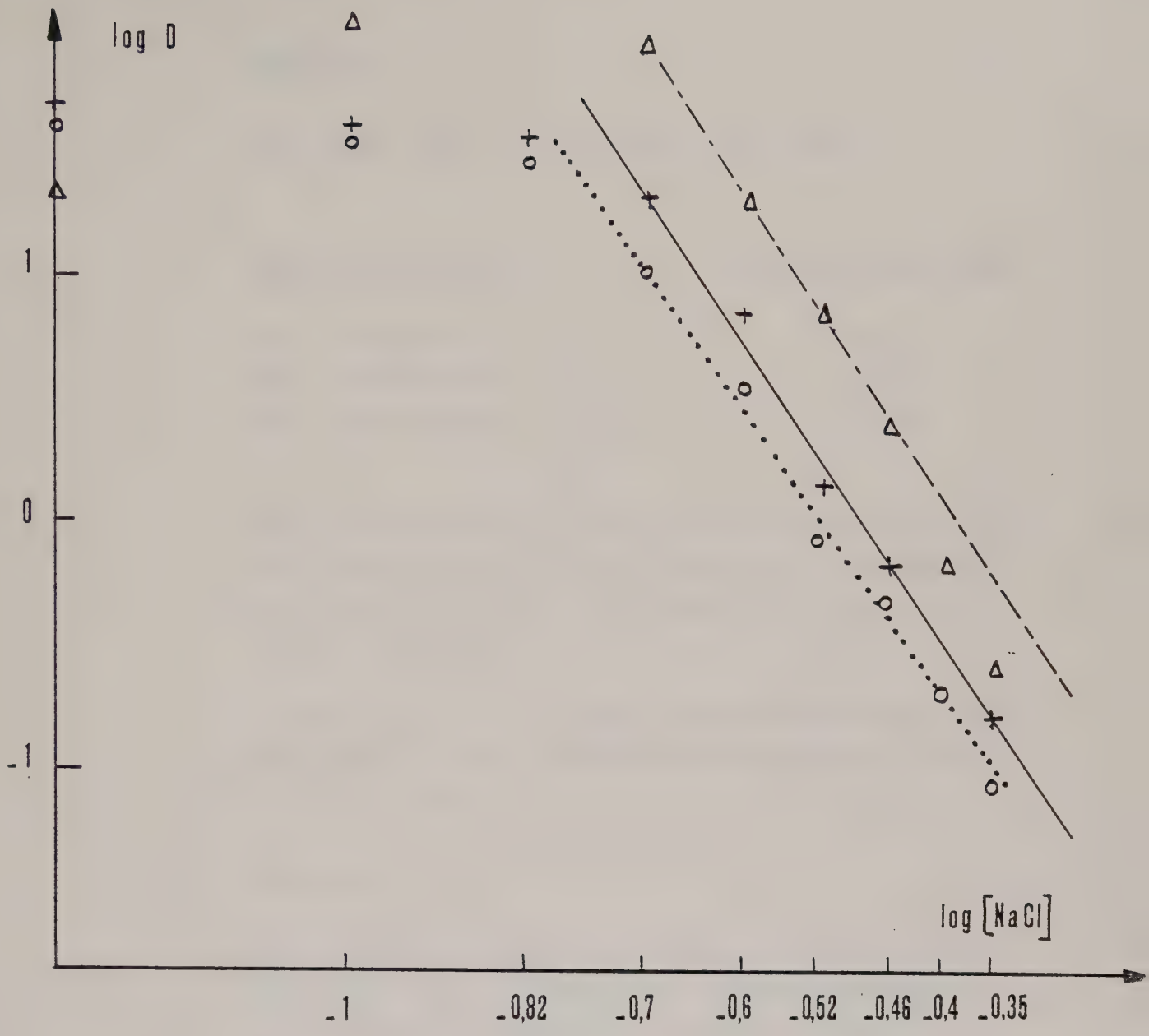


Figure 7 Courbes log D = f (log [NaCl])

\+ du complexe H.M.D.P. / Sn / Tc

o du complexe H.M.D.P. / Sn / Tc / acide ascorbique

Δ du complexe H.M.D.P. / Sn / Tc / acide gentisique

. Résultats

Les courbes log D = f (log (NaCl) (voir figure 7)

	Sans acide ascorbique	Avec acide ascorbique
ord. à l'origine	- 3,05	- 3,23
coef. de regression	- 6,33	- 6,35
coef. de corrélation	- 0,993	- 0,999

Pour s'assurer que l'antioxydant est réellement inerte ou tout du moins sans action sur la valeur de la charge, on a choisi un autre produit l'acide gentisique, avec lequel on refait l'expérience :

la courbe log D = f (log (NaCl)) avec acide gentisique a une pente égale à - 6,28 (coefficient de corrélation 0,999).

. Conclusion

Ni la présence de l'acide ascorbique, ni celle de l'acide gentisique n'ont d'influence sur la forme du complexe d'hydroxyméthylèn e diphosphate et par conséquent sur sa charge.

IV.2. - Etude de formulation

IV.2.1. - Principe

Puisque seul l'étain semble jouer un rôle dans la formation du complexe multi-chargé, nous avons étudié la charge du complexe

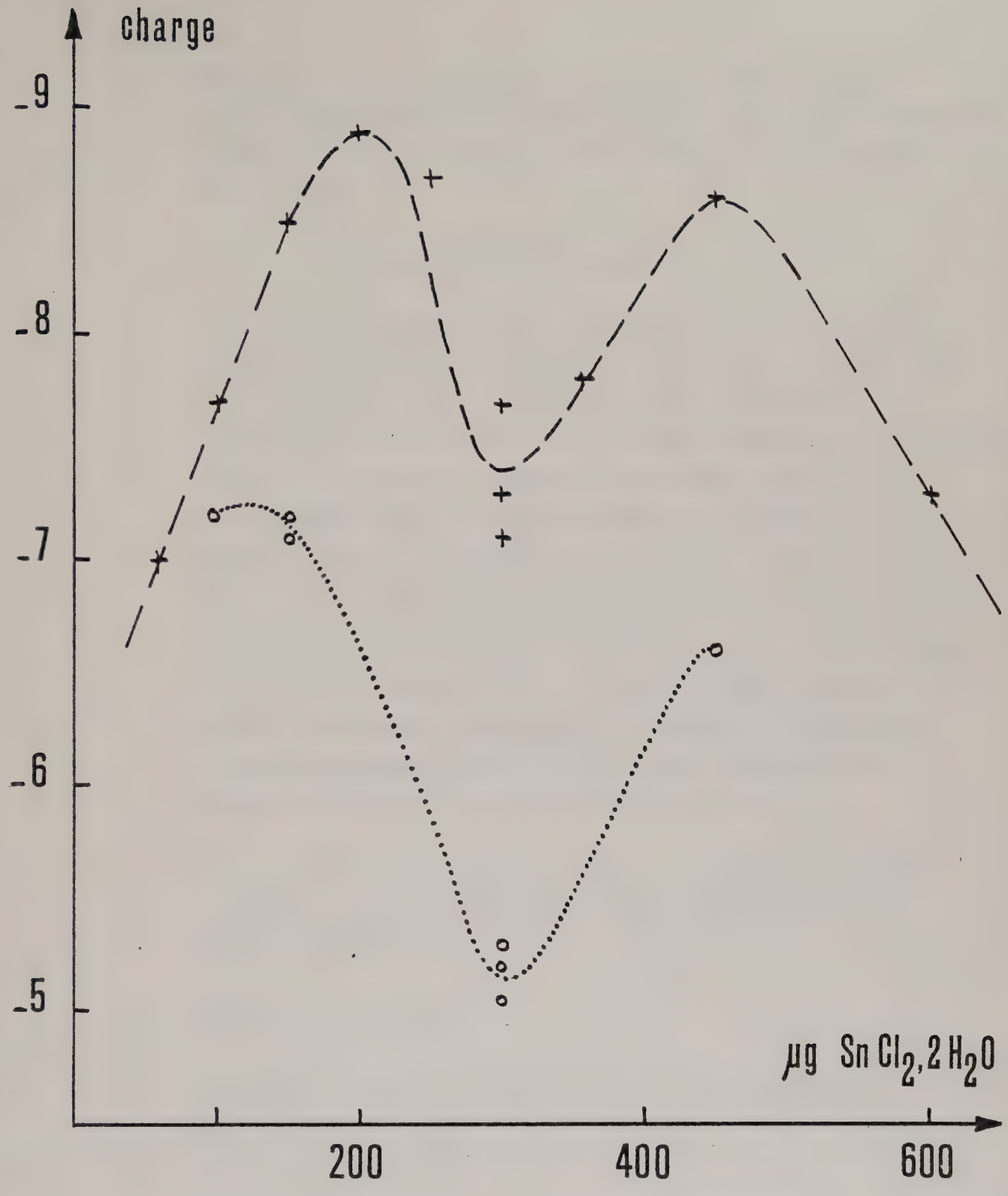


Figure 8 Valeur de la charge en fonction de la quantité de chlorure stanneux

HMDP - Sn - Tc en fonction de la quantité d'étain présent.
Pour une même quantité de HMDP, nous avons fait varier la quantité d'étain de 60 µg à 750 µg, l'étain étant pris sous forme de $SnCl_2$, 2 H_2O.

IV.2.2. - Mode opératoire et résultats

On pèse les différentes quantités d'étain, que l'on introduit respectivement dans des flacons type pénicilline contenant 1 ml d'une solution de HMDP 2 mg/ml, on ajuste le pH entre 5 et 7, on amène le volume final à 2 ml et on met le mélange en atmosphère d'argon. On marque les produits ainsi obtenus avec du ^{99m}Tc et on procède comme indiqué précédemment pour déterminer la charge de chacun des complexes ainsi formés. Les manipulations ont été effectuées à l'aide de deux flacons de résine différente, les résultats obtenus nous interdisent de donner des charges en valeur absolue mais en valeur relative par rapport à une résine (figure 8) car d'une résine à l'autre les valeurs peuvent varier relativement. On observe sur la courbe un minima pour la quantité égale à 0,300 mg Sn Cl_2 , $2H_2O$ et deux maxima respectivement pour les quantités 0,200 et 0,450 mg.

Pour la valeur 0,760 mg Sn Cl_2, $2H_2O$, en dehors de la courbe ci-jointe, nous avons obtenu une charge relative proche de moins un (-0,75).

IV.2.3. - Conclusion

Nous observons pour une même quantité d'hydroxyméthylène diphosphonate disodique une variation de la charge en fonction de la quantité d'étain stanneux présente.

Ces résultats montrent que l'étain entre bien dans la formation du complexe H.M.D.P - Tc - Sn ; mais il ne nous est pas encore possible de dire à quel stade de la réaction.

IV.3. - Réduction avec le dithionite de sodium

IV.3.1. - Principe

Le but de cette manipulation est de former le complexe d'hydroxyméthylène diphosphonate en l'absence d'étain Sn II et de mesurer la charge du complexe obtenu.

IV.3.2. - Mode opératoire

On introduit 1 ml d'une solution d'hydroxyméthylène diphosphonate disodique à 2mg/ml dans un flacon type pénicilline sous vide puis 1 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 0,05 M/1 et de l'acide chlorhydrique HCl 0,1 N pour ajuster le pH à 6,5.

On ajoute ensuite le ^{99m}Tc et 0,2 ml d'une solution de dithionite de sodium $Na_2S_2O_4$ (solution préparée extemporanément : 10 mg $Na_2S_2O_4$ dans 1 ml de Na_2CO_3 0,05 M/1) comme réducteur en solution.

IV.3.3. - Résultats

. Le rendement de marquage obtenu par chromatographie du produit avec l'acétone comme solvant est de 95 %.

. La courbe log D = f (log (Nacl)) a une allure très différente de celle des complexes HMDP - Sn - Tc car elle se partage en deux tronçons :

un de pente - 3,2	ord. l'origine - 0,87	coef de corrélation	0,99
et l'autre de pente 0	+ 0,8		0,98

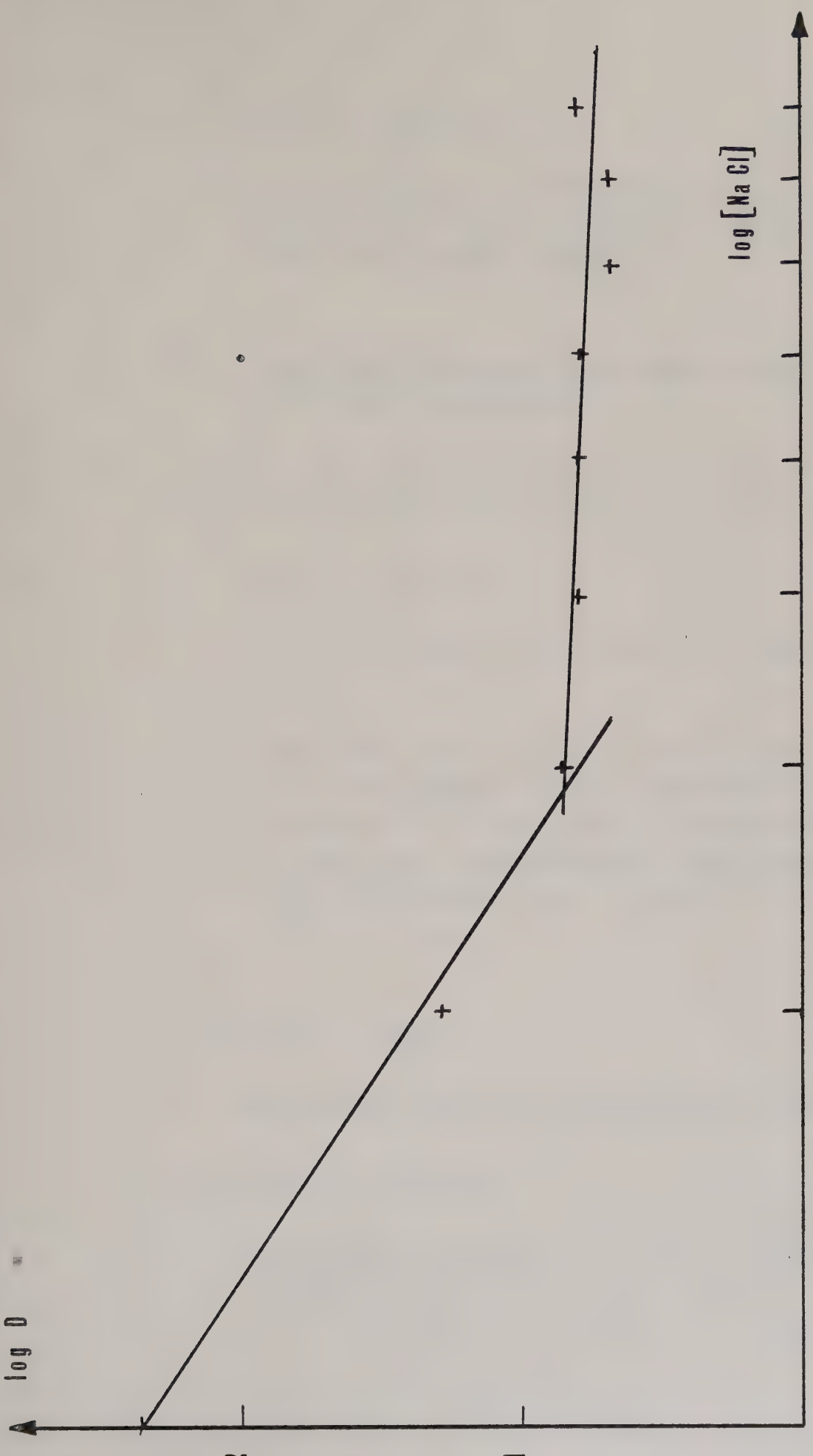


Figure 9 Courbe log D = f (log [Na Cl]) pour le complexe Tc - H.M.D.P. - dithionite

IV.3.4. - Conclusion

Le ou les complexes Tc - HMDP dithionite sont très différents de celui ou ceux obtenus avec l'étain, l'allure de la courbe figure 9 est également différente.

IV.4. - Comparaison de certains produits commercialisés ou non, utilisés pour l'imagerie du squelette

La suite logique de ce travail est de mesurer et de comparer la charge de divers produits destinés à l'imagerie du squelette.

IV.4.1. - Protocole

Nous avons procédé de la même manière pour tous les produits, à savoir :

. nous avons repris le lyophilisat ou les pesées par 2 ml d'eau distillée désaérée, puis nous avons introduit une quantité voisine de ^{99m} Tc; nous agitons 10 minutes et nous mettons en contact avec la résine échangeuse d'ion 20 minutes, après quoi, nous mesurons l'activité totale de la seringue puis celle de l'éluat.

IV.4.2. - Résultats

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau VII

IV.4.3. - Conclusion

Nous remarquons que les produits les plus chargés sont le HMDP et le DPD.

TABLEAU VII - COMPARAISON DES CHARGES DE DIVERS PRODUITS RADIOPHARMACEUTIQUES

RAPPORTS MOLAIRES

COMPOSE	FORMULATION	COMPOSE / $SnCl_2,2H_2O$	$SnCl_2,2H_2O$ / COMPOSE	Rendement de marquage	Charge	Coefficient Corrélation
(A) H.M.D.M.	2mg HMDP, 2Na 0,3 mg $SnCl_2,2H_2O$	6,4	15,3	99,0	- 7	(0,99)
(A) M.D.P.	10 mg MDP 1mg $SnCl_2,2H_2O$	12,8	7,75	99,9	- 6	(0,99)
(A) D.P.D.	13 mg DPD, 4Na 0,23 mg SnO	-	-	99,9	- 7,3	(0,99)
(A) I.D.P.	25 mg IDP $4Na10H_2O$ 1mg $SnCl_2$, $2H_2O$	12,8	7,8	-	- 4,5	(0,99)
(A) 2 aminoéthyl-phosphanie-acide	14 mg 2 amine 1 mg $SnCl_2$, $2H_2O$	27	3,9	99,8	0	
(B) HMDP	2 mg HMDP,2 Na 0,3 mg $SnCl_2,2H_2O$	6,4	15,3	99,0	- 5,3	(1,00)
(B) HMP	3 mg HMP 0,24 mg $SnCl_2$	-	-	99,8	- 5,1	(0,99)
(B) PiP	100 mg PiP,$10H_2O$ 1,6 mg $SnCl_2$, $2H_2O$	32	3,1	99,4	- 3,5	(0,98)

Produit CEA
Produit Teceos
Produit synthétisé
Produit Procter et Gamble formulation inconnue en détail.

(A) et (B) Deux résines non totalement identiques.

CHAPITRE V

V. - STRUCTURE DES COMPLEXES

L'étude de la formulation nous montre l'importance de la quantité d'étain présente dans la solution.

L'étain entre dans la formation du complexe HMDP - Sn - Tc de façon certaine. Désormais, la preuve en est fait puisque l'utilisation de l'étain actif ne nous avait pas permis de l'affirmer.

Maintenant, il nous faut isoler le complexe :

réducteur - agent complexant (Sn - H.M.D.P)

V.1. - Précipitation à l'aide d'un contre-ion de cobalt

V.1.1. - Principe

Nous avons supposé que le complexe H.M.D.P - Sn existe et que c'est un anion fortement chargé (charge relative de -7). On utilise un contre-ion assez gros, par exemple l'ion $\left[Co(NH_3)6\right]^{2+}$ pour former un précipité avec notre complexe.

Il nous est possible alors par analyse spectrographique d'émission de déterminer le taux de participation de l'étain.

V.1.2. - Mode opératoire

(PASCAL 1963). En saturant d'ammoniac une solution aqueuse de sulfate de cobalt (FREMY 1852), puis en précipitant par l'alcool, on obtient l'hexammine cobalt II : $Co\ (NH_3)_6\ SO_4$ qui filtré et repris par de l'eau donne une solution pourpre ayant un pH égal à 10.

Notre contre ion $(Co(NH_3)6)^{2+}$ ainsi obtenu est introduit dans les différentes préparations HMDP - Sn correspondant aux charges - 0,75 (-1), - 7 et - 9.

Nous avons obtenu des précipités lourds qui après filtration et séchage à l'air à température ambiante, ont été analysés par spectrographie d'émission.

V.1.3. - Résultats

Nous avons obtenu les pourcentages en poids d'échantillon des éléments suivants : Co - P - Sn donnés ci-dessous ainsi que de leurs rapports molaires :

	CHARGE	- 0,75 (-1)	- 7	- 9
Pourcentages	% Co	8,8	7,2	10,9
	% Sn	16	4,4	7,2
	% P	8	7	10,2
Rapports Molaires	Sn/Co	1/1,1	1/3,3	1/3
	Sn/P	1/2	1/6,1	1/5,4
	P/Co	2/1,13	2/1,08	2/1,12

V.1.4. - Conclusion

On observe que le rapport P/Co reste constant dans les trois cas, c'est à dire un atome de cobalt pour une molécule de HMDP.

D'autre part, le rapport Sn/P indique que pour la charge - 1 1 Sn s'associe à une molécule de HMDP et que pour les complexes fortement chargés 1 Sn est lié à trois molécules de HMDP.

CHAPITRE VI

VI. - LA PERMEATION SUR GEL

La détermination de la charge et l'élaboration d'une éventuelle structure du complexe HMDP - Sn - Tc nous laissent supposer que celui-ci est un complexe de taille non négligeable ; d'où l'idée d'en mesurer l'encombrement à l'aide de la chromatographie sur gel.

VI.1. - Principe

Les séries de Bio Gel P, gel polyacrylamide neutre sont produits par la copolymérisation d'acrylamide ($H_2C = CHCONH_2$) avec des produits méthylène bis acrylamide ($H_2C = CHCONH - CH_2 - NHCO - CH = CH_2$)

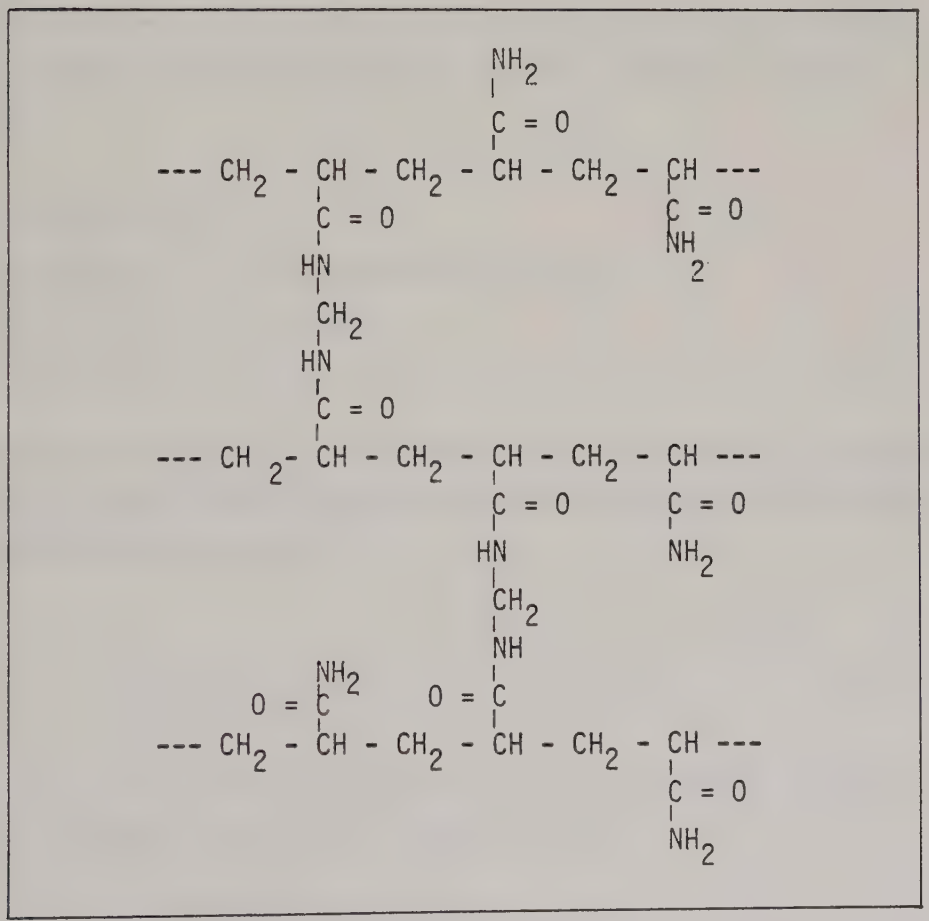


FIGURE 10 : STRUCTURE DE LA MATRICE DE GEL POLYACRYLAMIDE BIO GEL P

Les Bio Gel P sont généralement considérés comme étant inertes biologiquement. Leurs caractéristiques les plus importantes sont :

. la limite d'exclusion et la taille des particules.

Les particules d'un gel sont formées par un réseau tridimensionnel et se présentent sous forme de très petites sphères. Les molécules de dimension supérieure aux pores du gel ne traversent pas les grains et sont rapidement éluées. D'autre part les molécules qui diffusent au travers des pores de la matrice quittent le gel dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

L'élution se fait avec du chlorure de sodium 0,15 M. L'éluat est recueilli à la sortie de la colonne à l'aide d'un collecteur de fraction millilitre par millilitre puis l'activité est mesurée.

Pour améliorer la qualité de la chromatographie sur colonne, il nous est possible de faire varier un certain nombre de facteurs, on peut citer :

. la nature du gel,
. la dimension des pores composant le gel,
. la taille de la colonne,
. la nature de l'éluat.

En faisant varier un ou plusieurs de ces paramètres, il nous est plus aisé de donner une interpréation des courbes d'élution de la radioactivité obtenue.

VI.2. - Protocole

On utilise une colonne de 50 cm de long et 1 cm de diamètre. On élue avec du sérum physiologique (NaCl 0,15 M).

VI.3. - Résultats

Le tableau VII indique les résultats obtenus avec des colonnes contenant du Bio Gel P2 ou du Bio Gel P10.

TABLEAU VIII : Volume d'élution des comples sur Bio Gel P

FORMULATION	RENDEMENT DE MARQUAGE	PIC D'ELUTION	
		Bio Gel P2	Bio Gel P10
HMDP - 1	99,8 %	17 ml	36 ml
HMDP - 7	99,1 %	17 ml	33 ml
HMDP - 8	99,8 %	18 ml	35 ml
HMDP - 9	99,7 %	15 ml	31 ml
Volume d'exclusion dextran		13 ml	14 ml

Le Gel P2 100-200 mesh ne permet pas de séparer les produits, les complexes sont pratiquement exclus (volume d'exclusion = 13, volume d'élution = 15 - 18).

Avec le Bio Gel P10 100 - 200 mesh les complexes pénètrent dans les pores. Leurs volumes d'élution sont très proches, et le pic est unique. Cela montre qu'il s'agit d'une seule espèce de taille voisine (Figures 11 et 12).

La chromatographie sur colonne ne nous fournit pas de résultats quantitatifs. La totalité de l'activité injectée en tête de colonne n'est pas recueillie. Seuls, les complexes sont élués, le pertechnétate l'est peu et le Tc hydrolysé ne migre pas.

VI.4. - Conclusion

Nous avons vu que le complexe est élué pratiquement avec le volume d'exclusion de la colonne lorsque celle-ci est remplie par le Bio Gel P2 100-200 mesh, ce qui correspond approximativement à un domaine d'utilisation de 100-1800 daltons.

On a alors utilisé le Bio Gel P 10 100-200 mesh dont le domaine d'utilisation est compris entre 1500 et 20 000 daltons ; le complexe pénètre alors dans les pores du gel on peut donc dire que son poids moléculaire est légèrement supérieur à 1 800 daltons et largement inférieur à 20 000 daltons.

Dans ces conditions, nous pouvons en conclure que les complexes H.M.D.P. - Sn - Tc quelle que soit leur charge sont des complexes de taille importante et relativement proches les uns des autres, ce qui laisse supposer la formation de polymères.

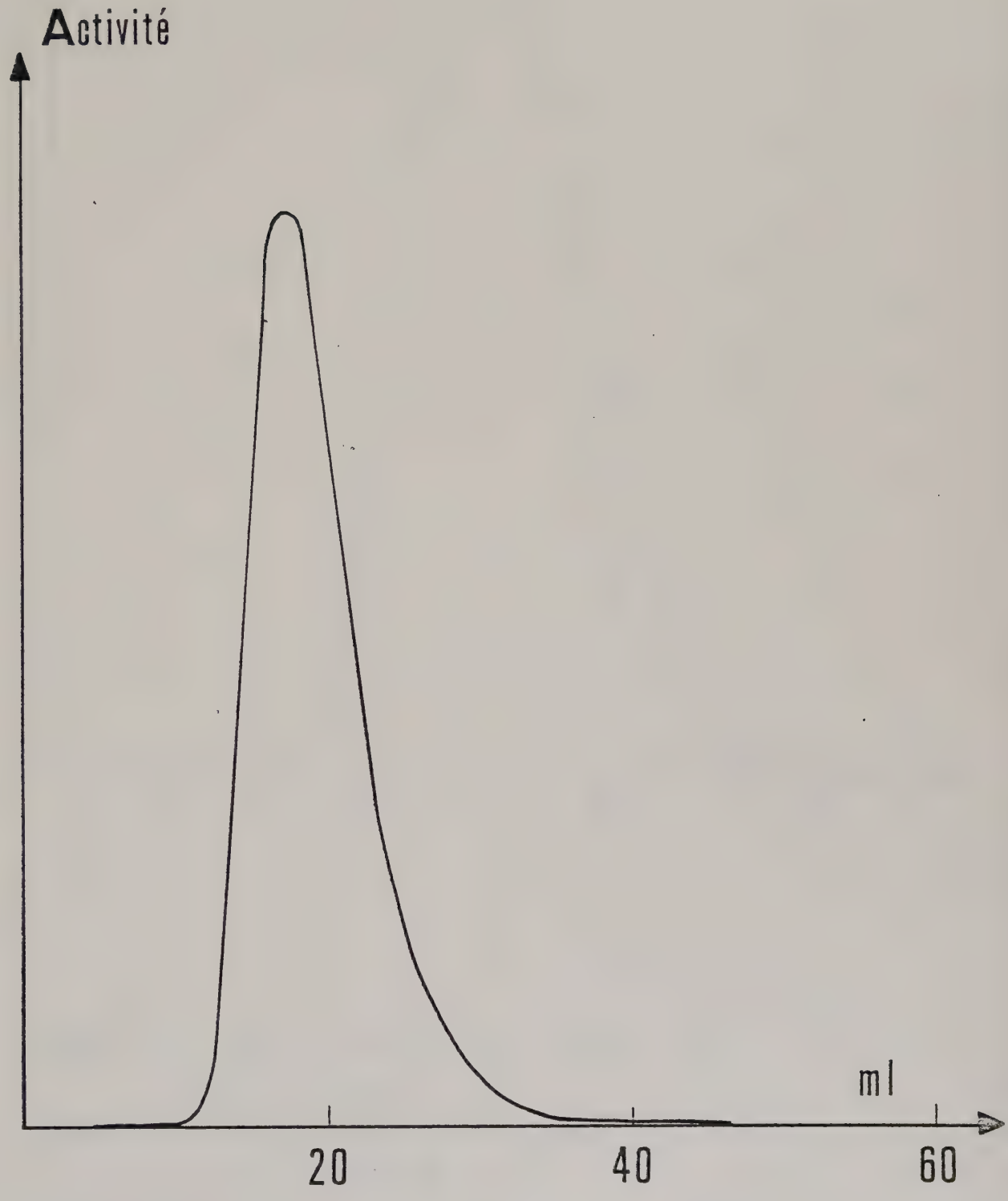


Figure 11 Profil d'élution sur Bio Gel P 2

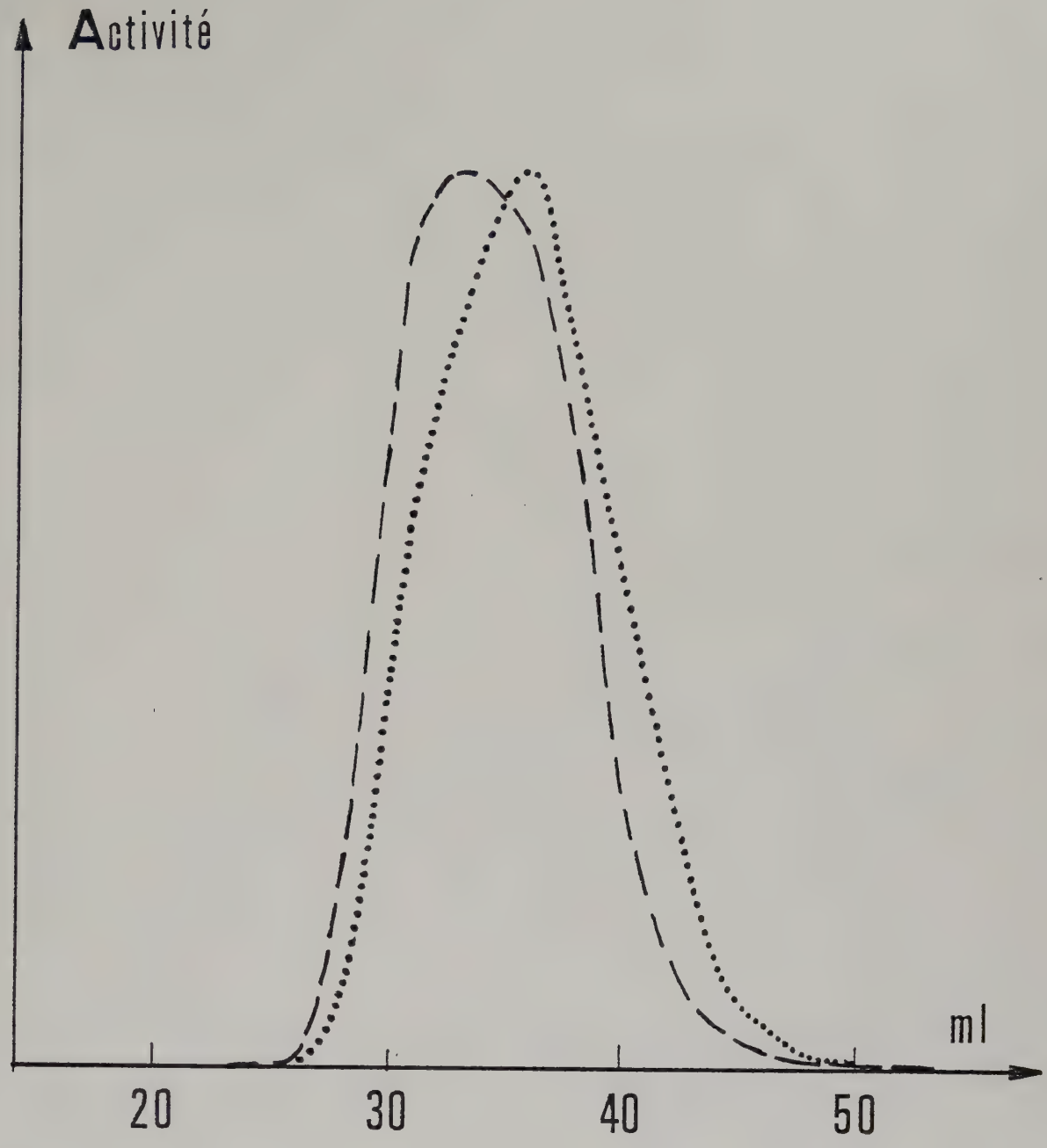


Figure 12 Profils d'élution sur Bio Gel P 10

---- charge -7

..... charge -1

CHAPITRE VII

VII. - ANALYSE BIOLOGIQUE

Les complexes étudiés comportent tous un groupement phosphate ou phosphonate. Ces groupements, comme nous l'avons vu au chapitre I.4. interviennent dans le métabolisme osseux et permettent la fixation de ces complexes dans le squelette.

VII.1. - Analyse biologique à la gamma caméra

VI.1.1. - Principe

La charge des différents complexes est obtenue de façon précise. Nous avons étudié son influence sur leur fixation dans l'organisme au moyen d'une gamma caméra.

La gamme caméra (CGR) est un équipement destiné à visualiser et à mesurer la répartition de la radioactivité dans un organe ou dans l'organisme dans son champ d'observation. Le système se compose d'une tête de détection statique et d'un pupitre de commande équipé d'un appareil photographique type Polaroïd. La gamma caméra est couplée à un système de traitement des données qui grâce à un microprocesseur permet la visualisation et la quantification de la radioactivité sur un écran de télévision. La définition de l'image est de 4 mm.

VI.1.2. - Protocole expérimental

Les essais ont été réalisés sur des rats de souche Sprague Dawley. Après anesthésie à l'éther, les rats on subi une injection de 0,2 ml du produit à étudier dans la veine pudendale. On sacrifie le rat deux heures après cette injection et on pratique une scintigraphie à la gamma caméra.

Les produits injectés ont la même formulation que ceux utilisés pour la détermination de leur charge respective. Nous avons uniquement fait varier la concentration des produits en diluant avec du sérum physiologique.

VII.1.3. - Résultats

Les résultats sont regroupés dans le tableau IX.

VII.1.4. - Conclusion

Les résultats montrent que pour une même concentration $\frac{1}{20}$ la fixation osseuse varie dans le même sens que la charge du complexe ; par exemple : de 6,9 à 10,3 % de l'activité injectée dans les cartilages de conjugaison pour les charges allant de - 1 à -7 et que la visualisation du foie est fonction de la concentration et de la charge du complexe.

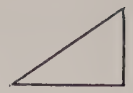
Plus un complexe est chargé, plus il est nécessaire de le diluer pour ne pas visualiser cet organe.

VII.2. - Analyse biologique par biodistribution

Pour les complexes dont les valeurs de charge se relèvent être trop voisines, une biodistribution par dissection des rats a été pratiquée afin d'obtenir une évaluation très précise de la fixation osseuse qui aurait été impossible à l'aide de la gamma caméra.

VII.2.1. - Protocole expérimental

Nous avons étudié la répartition biologique fine des trois complexes de H.M.D.P dont la charge oscille entre -7 et -9.

% d'activité dans :  les cartilages de conjugaison le foie

Produits injectés / Dilution	H.M.D.P. 1mg/ml -1	Aminoéthylphosphonique acide 7mg/ml 0	H.M.D.P.-dithionite 1mg/ml -3	Imidodiphosphate 12,5mg/ml -4,5	H.M.D.P. 1mg/ml -7
Solution mère	4,2 / 23				
1/2	4,7 / 25				
1/4	5,5 ± 0,2 / 0	5 ± 0,4 / 0	4,3 ± 0,8 / 30	5,3 ± 0,1 / 45 ± 5	6,6 ± 0,2 / 18 ± 2
1/20	6,9 / 0	5,6 / 0	7,8 / 0	5,5 / 0	10,3 / 0

TABLEAU IX - ANALYSE BIOLOGIQUE A LA GAMMA CAMERA

Les complexes ont été préparés de la façon suivante :

Formulation . 2 mg H.M.D.P + 0,300 mg $SnCl_2$. 2 H_2O

. 2 mg H.M.D.P + 0,150 mg $SnCl_2$. 2 H_2O

. 2 mg H.M.D.P + 0,450 mg $SnCl_2$. 2 H_2O

Les solutions ont été obtenues par dissolution dans 2 ml de NaCl 9‰. On prélève 1 ml que l'on jette puis on dilue le ml restant à 10 ml avec du NACl 9‰. On marque chacune des solutions avec 80 µCi de ^{99m}Tc.

L'injection intraveineuse de 0,2 ml est effectuée dans la veine pudendale sur des rats anesthésiés à l'éther. La souche de rats utilisés est la souche Sprague Dawley.

Cinq rats ont été injectés pour chaque concentration étudiée, le sacrifice a été fait par ponction du sang dans l'aorte abdominale une heure et deux heures après injection.

VII.2.2. - Résultats

Les résultats sont regroupés dans le tableau X et sur la figure 13.

L'étude statistique des résultats a été réalisée à l'aide du test t de Student et Fisher. Ce test nous permet de comparer les moyennes deux à deux et de vérifier si leur différence est significative.

La variance est définie par :

$$\sigma^2 = \frac{\Sigma (x - m1)^2 + \Sigma (x - m2)^2}{n1 + n2 - 2}$$

où n1 et n2 sont les nombres de rats utilisés, m1 et m2 sont les moyennes des résultats, x - m1 est l'écart type de la moyenne, n1 + n2 - 2 = ν dit "nombre de degré de liberté".

La variance standart de la différence est donc :

$$sd^2 = \sigma^2 \left(\frac{1}{n1} + \frac{1}{n2} \right) \quad \text{et le rapport} \quad t = \frac{| m1 - m2 |}{s_d}$$

Formulation	UNE HEURE APRES INJECTION			DEUX HEURES APRES INJECTION		
	2 mg H.M.D.P.			2 mg H.M.D.P.		
	0,30 mg $SnCl_2,2H_2O$	0,15 mg $SnCl_2,2H_2O$	0,45 mg $SnCl_2,2H_2O$	0,30 mg $SnCl_2,2H_2O$	0,15 mg $SnCl_2,2H_2O$	0,45mg $SnCl_2,2H$
Charge relative	- 7	- 8,3	- 8,6	- 7	- 8,3	- 8,6
Rendement de marquage	98 %	98 %	99,4 %	98 %	98 %	99,4 %
Poids rat en g	190 - 195	177 - 197	180 - 190	185 - 205	183 - 193	180 - 190
% dose injectée par ml sang	0,085 ± 0,026	0,039 ± 0,004	0,052 ± 0,007	0,031 ± 0,007	0,021 ± 0,006	0,028 ± 0,003
% dose injectée par g de foie	0,544 ± 0,348	0,205 ± 0,091	0,181 ± 0,056	0,561 ± 0,208	0,250 ± 0,068	0,156 ± 0,032
% dose injectée par g de fémur	3,214 ± 0,156	3,992 ± 0,267	4,237 ± 0,172	3,350 ± 0,177	3,860 ± 0,252	4,011 ± 0,282

TABLEAU X - % ACTIVITE INJECTEE DES SOLUTIONS DES COMPLEXES HMDP DANS PLUSIEURS ORGANES UNE HEURE ET DEUX HEURES APRES INJECTION

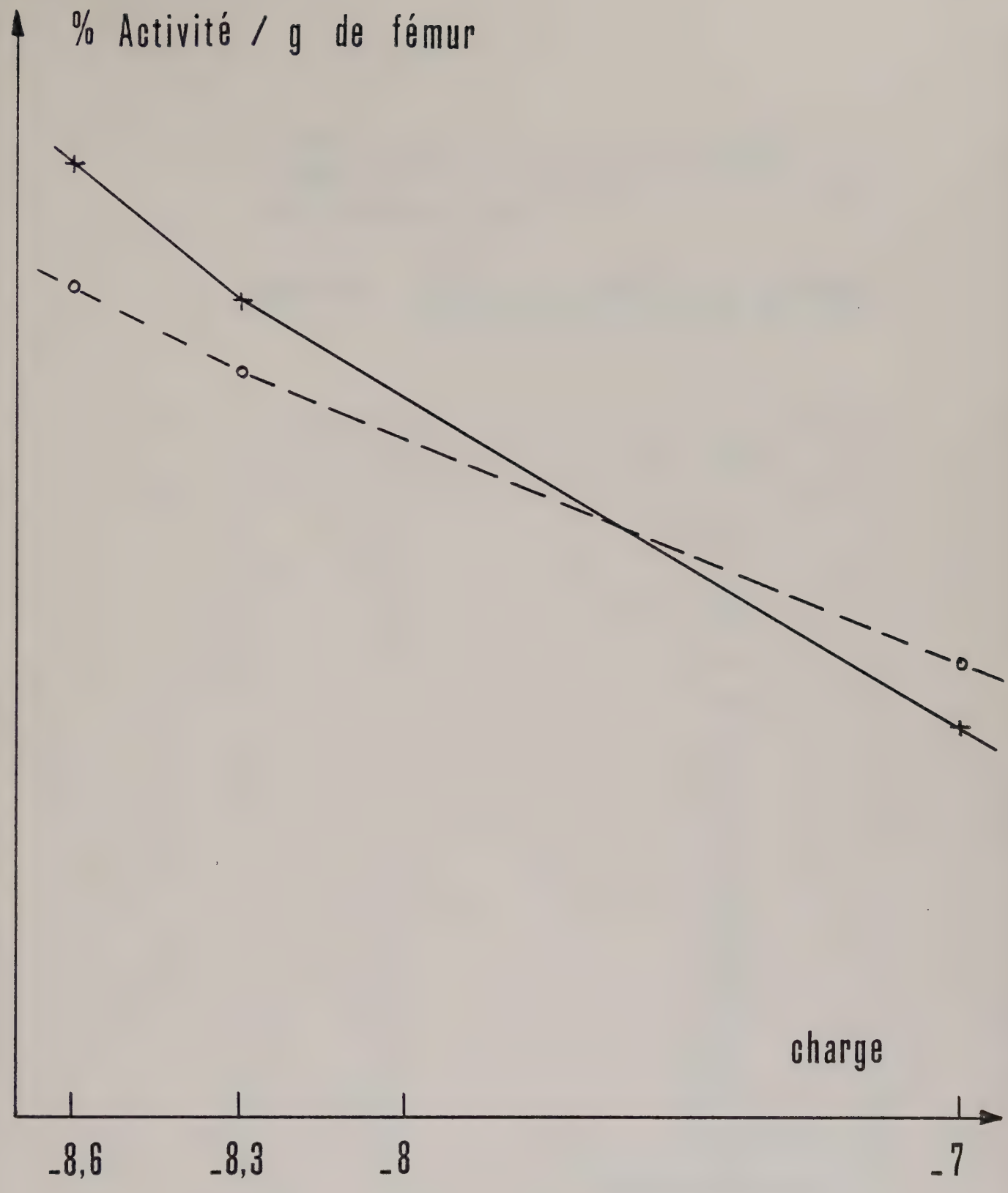


Figure 13 Fixation osseuse en fonction de la charge

+ une heure
o deux heures

après injection

Le tableau XI nous donne les valeurs limites du paramètre t en fonction du nombre de degré de liberté ν pour une sécurité de 95 %.

Tableau XI : Limites T_ν du paramètre t correspondant aux coefficients de sécurité 95 % pour différentes valeurs de ν.

$\nu = n - 1$	T_ν (95 %)
1	12,71
2	4,30
3	3,18
4	2,78
5	2,57
6	2,45
7	2,36
8	2,31
9	2,26
10	2,23
12	2,18
14	2,14
16	2,12
18	2,10
20	2,09
25	2,06
30	2,05
....	.....
∞	1,96 (soit 2 en pratique)

Si la valeur expérimentale est plus élevée que le seuil, la différence entre les moyennes comparées deux à deux est statistiquement significative.

TABLEAU XII : VALEURS EXPERIMENTALES POUR LE CALCUL DE t

	Une heure après injection			Deux heures après injection		
	7/8,3	7/8,3	8,3/8,6	7/8,3	7/8,6	8,3/8,6
σ^2	0,048	0,0271	0,0506	0,0507	0,0552	0,0747
S^2_d	0,0192	0,0108	0,0202	0,0203	0,0221	0,0299
sd	0,1385	0,104	0,142	0,142	0,149	0,173
t	5,617	9,827	1,718	3,581	4,448	0,873
T_8	2,31			2,31		

$$\nu = n1 + n2 - 2 \quad = \quad 5 + 5 - 2 = 8$$

Pour une sécurité de 95 % le seuil de $T\nu$ pour un degré de liberté de 8 est T8 = 2,31

VII.2.3. - Discussion

Les valeurs trouvées pour t en comparant les moyennes des produits " -7 et -8,3" et " -7 et -8,6" sont supérieures à ce seuil.

La différence des moyennes de fixation par g de fémur des produits correspondants est significative. La fixation osseuse obtenue à l'aide des produits de charge " -8,3" et "-8,6" est supérieure au produit de charge "-7".

VII.3. - Analyse biologique par circulation extracorporelle

VII.3.1. - Principe

L'étude de la cinétique sanguine d'un produit permet d'en préciser le devenir dans l'organisme.

L'échange d'un produit entre le pool sanguin et le (ou les) organe cible est une réaction d'équilibre. Elle se traduit par une décroissance de la concentration sanguine suivant une (ou plusieurs) exponentielle : c'est la théorie des compartiments.

Dans le cas d'un produit radiopharmaceutique, la décroissance de la concentration est directement liée à celle de la radio activité sanguine, ce qui permet une étude directe des échanges entre les différents compartiments (COHEN 1964).

VII.3.2. - Protocole expérimental

Nous avons pratiqué la dérivation de la carotide gauche de rats mâles de souche Sprague Dawley. Cette dérivation, placée

sous un compteur à scintillation permet d'enregistrer graphiquement et numériquement la décroissance de la radio-activité. L'injection du produit à étudier se fait directement dans l'oreillette droite à l'aide d'une canule introduite par la veine jugulaire.

VII.3.3. - Résultats

L'analyse des courbes d'épuration sanguine dont un exemplaire est donné par la figure 14, après leur report à l'aide des données numériques sur papier semi-logarithmique fait apparaître trois exponentielles, caractérisées par leur temps de demi réaction T figure 15.

La caractérisation a été déterminée à l'aide de la gamma caméra. Les photographies et comptages correspondant aux temps 5, 10, 20 et 40 minutes (voir tableau XIII) (et figure 16) nous permettent de définir les courbes obtenues de la façon suivante :

. la première exponentielle correspond à la dilution du composé radioactif dans le sang, en effet le coeur est visualisé sur la première photographie.

. la seconde exponentielle correspond à l'élimination urinaire.

. la troisième exponentille correspond à la fixation osseuse.

Le temps de demi réaction de chacun des compartiments en fonction de la charge du produit est donné dans le tableau XIV.

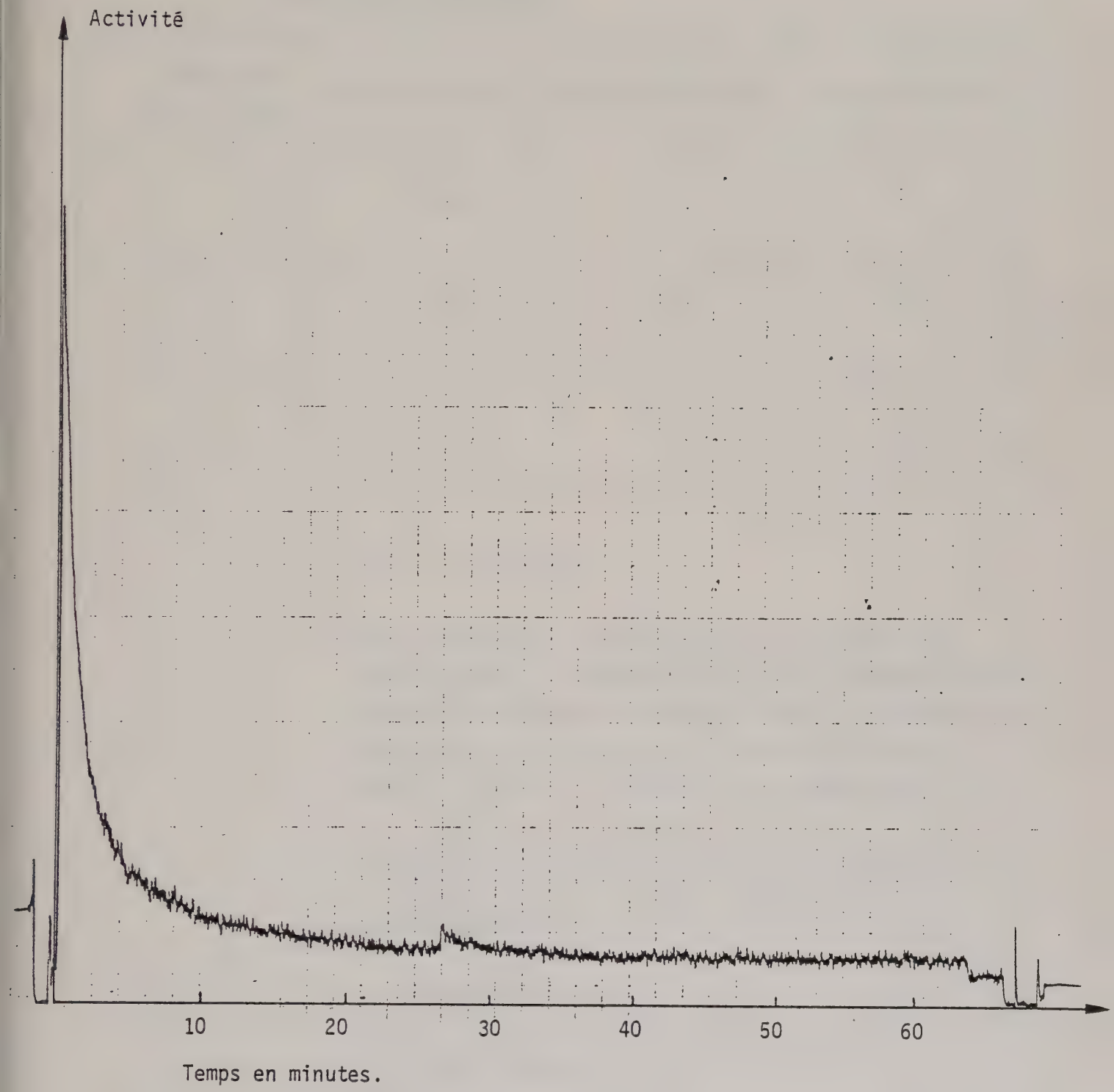


FIGURE 14 - EPURATION SANGUINE EN FONCTION DU TEMPS DU COMPLEXE HMDP - Sn - Tc

TABLEAU XIV : TEMPS DE DEMI REACTION DE CHACUN DES COMPARTIMENTS EN FONCTION DE LA CHARGE DES COMPLEXES

CHARGE DU COMPLEXE HMDP	T1 DILUTION SANGUINE	T2 ELIMINATION URINAIRE	T3 FIXATION OSSEUSE
- 9	0,8 mn	2,0	27
- 8	0,5 mn	2,5	26,5
- 7	0,9 mn	1,6	28

VII.3.4. - Discussion

Aucune différence n'apparaît dans les cinétiques des trois produits. La décomposition en trois exponentionnelles distinctes confirme les résultats obtenus à l'aide de la gamma caméra. La différence de charge des produits n'a aucune influence sur le métabolisme osseaux et urinaire.

Le produit après injection intraveineuse n'est utilisé que par deux compartiments de l'organisme du rat qui se traduisent par :

- l'élimination urinaire,

- la fixation osseuse.

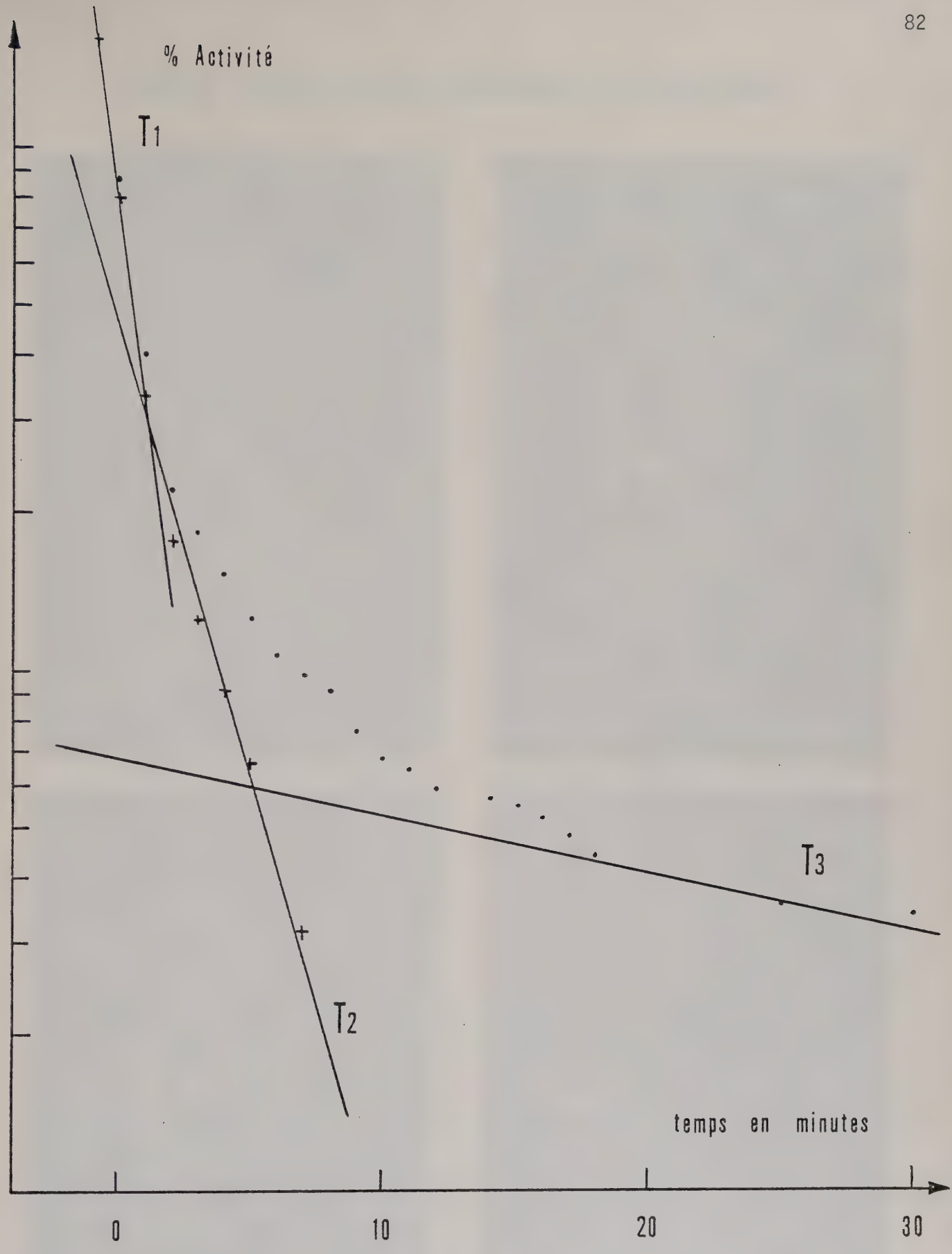
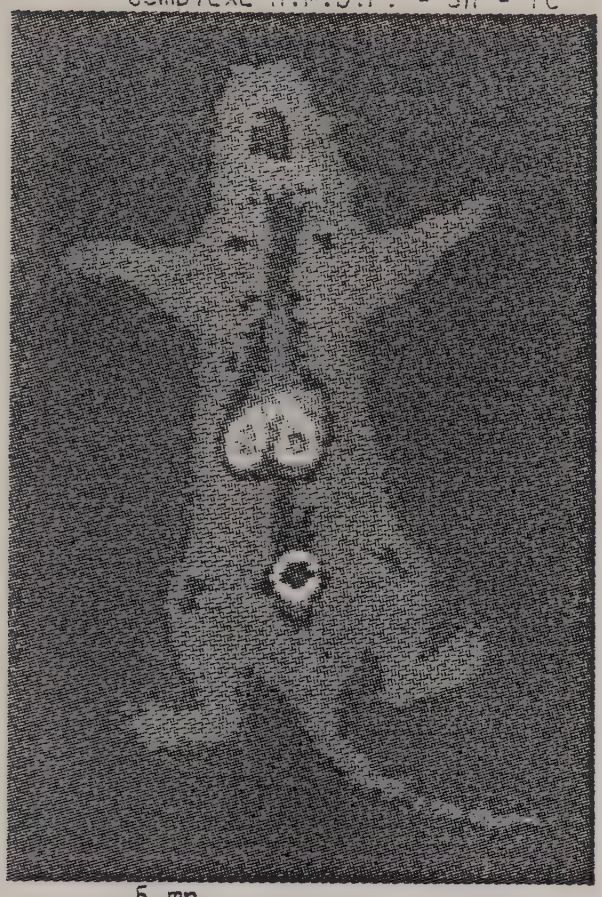


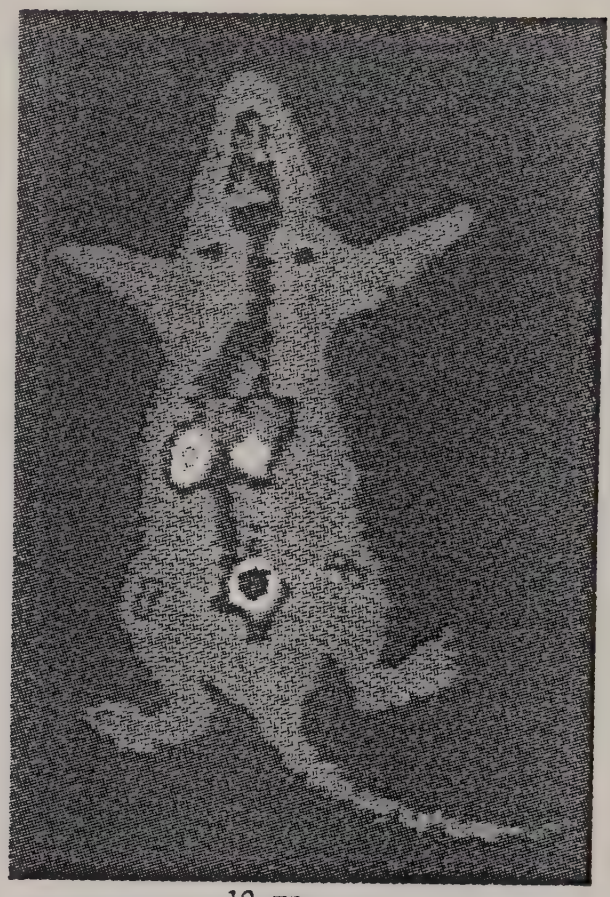
Figure 15 Configuration semi logarithmique de l'épuration sanguine en fonction du temps du complexe H.M.D.P./Sn/Tc

FIGURE 16 - IMAGES SCINTIGRAPHIQUES PRISES A LA GAMMA CAMERA

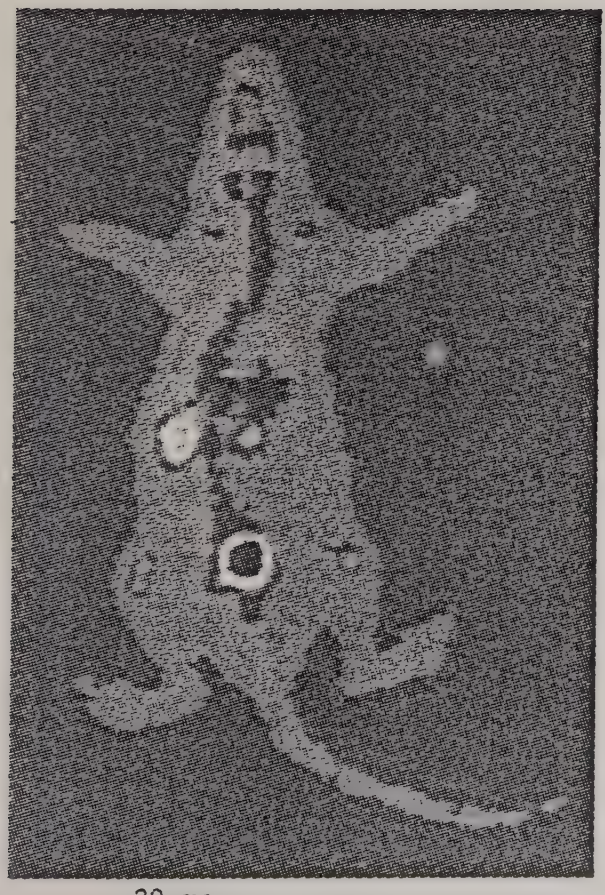
Complexe H.M.D.P. - Sn - Tc



5 mn



10 mn



20 mn

40 mn

TABLEAU XIII : % ACTIVITE INJECTEE DU COMPLEXE (HMDP - Sn - Tc) POUR DIVERS ORGANES A DIFFERENTS TEMPS APRES INJECTION

TEMPS	5 MINUTES	10 MINUTES	20 MINUTES	40 MINUTES
Coeur	2	0	0	0
Rein	7,6	5,7	2,8	1,2
Vessie	9	16,3	24,9	34,2
Cartilages de conjugaison	1,55	2,08	2,66	3,18

CONCLUSION

Le complexe HMDP - Sn - Tc est un produit radiopharmaceutique utilisé en médecine nucléaire pour l'étude de la fonction osseuse.
Si sa répartition biologique dans l'organisme est bien connue, en revanche, sa structure l'est moins.

Ceci nous a conduit à entreprendre une étude de la complexation du H.M.D.P avec l'étain stanneux et le technétium 99 m et son comportement biologique corrélatif.

L'étude de la variation de la charge du complexe par échange d'ions en fonction de la quantité d'étain stanneux présente, nous a montré l'importance de ce facteur. La charge peut varier de - 1 à - 9.

L'utilisation de plusieurs systèmes réducteurs tels que l'étain stanneux et le dithionite conduit à des complexes différents, ce qui prouve que l'étain et le technétium 99 m entre dans la structure du complexe. Cet état est corroboré par la précipitation des complexes HMDP - Sn de charges différents -1, -7 et -9 par un contre-ion de cobalt $(Co\ (NH_3)6)^{2+}$, précipités qui ont été analysés par spectrographie d'émission. Les résultats ont permis de déterminer que trois HMDP s'associent à un étain pour conduire à des complexes chargés de -7 à -9, tandis que le complexe à charge - 1 correspondrait à l'association d'un HMDP pour un étain.

Les résultats de la chromatographie sur Bio Gel P2 et P10 permettent de dire que les complexes HMDP - Sn - Tc aux différentes charges ont un poids moléculaire supérieur à 1500 et largement inférieur à 20 000, ce qui en confirme une structure de type polymère.

L'étude de la biodistribution sur des rats des solutions de marquage contenant les complexes HMDP - Sn - Tc de charges différentes montre une importante filtration rénale et une fixation osseuse qui, elle, augmente en fonction de la valeur de la charge.

Cette étude montre que la présence de l'étain stanneux dans les produits radiopharmaceutiques à tropisme osseux n'a pas seulement une fonction de réducteur mais entre dans le produit biologiquement actif et en influence le comportement.

Cet aspect devrait être pris en considération dans l'étude de formulation des produits radiopharmaceutiques à venir.

BIBLIOGRAPHIE

. BARTELS - ROIJERS
Clin. Chim. Acta 61 - 135 (1975)

. BELLAMY
Infrarea spectra of complex molecules Méthuen (Londres) 1964

. COHEN - COSTEROUSSE - CHIVOT
Pharmacodynamie des colloïdes radioactifs
Minerva Nucl. Ital. 196 - 8 (6) 357 - 366

. CROSS
Introduction à la pratique de la spectroscopie infra-rouge
AZOULAY Paris 1967

. DAVIS - JONES
Seminars in Nuclear Medecine Vol. 6 n°1 (January), 19 (1976)

. GALLO
Annu. Chim. (ROME) 57, (1) 5 (1967)

. HEIN - BUROWOY and SCHWEDLER
Kolloid - Z - 1936. 74, 35

. HEINDEL - BURNS - HONDA - BRADY
The chemistry of radiopharmaceuticals MASSON
New York Chapter 17 (1978)

. HOSAIN - SPENCER
J. Nucl. Med. 19,350 (1978)

. HOSAIN - WANG
Radiopharmaceuticals structure - activity relationships -
Hartford USA (1980)

. I.U.P.A.C
Spectrophometric Data for Colominetric
Analysis p Viii (1963) Butterworths (Londres)

. KUNG - ACKERHALT
J. Nucl. Med 19, 1027 (1978)

. MOEDRITZER - IRANI
J. Inorg. Nuc. Chim. 22, 297 (1961)

. MORIN - BROX
Clin. Chim Acta 46, 113 (1973)

. OWUNWANNE - MARINSKY - BLAU
J. Nucl. Med. 18 (11), 1099 (1977)

. PEREZ
Traité de radiodiagnostic tome X Os pathologie générale par
LAVAL-JEANTET M.,
PALLARDY G, TRIAL R. MASSON - Paris (1983)

. RHODE - CRAFT
"Basics of Radiopharmacy" - C.V. Mosby Co : ST LOUIS (1978).

. SNELL - SNELL
Colorimetric methods of analysis p. 19 (1955) Van Nostrand (Londres)

. STEIGMAN - MEINKEN - RICHARDS
Int. J. App. Isot. 6, 601 (1975).

. TOFE - FRANCIS
J. Nucl. med. 15, 69.7 (1974)

. THORNE - ROBERTS
Inorganic chemistry Fritz EPHRAIM (Londres) 1948

. WANG
J. Nucl. Med 19, 1151 (1978)

. WANG - FAWWA - JOHNSON
J. Nucl. Med. 1, 767 (1980)

Madame GOUAILLARDOU Dominique

SUJET : ETUDE DE LA COMPLEXATION DE L'ETAIN STANNEUX ET DU TECHNETIUM 99m PAR L'HYDROXYMETHYLENE DIPHOSPHONATE (H.M.D.P.).

PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES ET COMPORTEMENT BIOLOGIQUE DES COMPLEXES.

RESUME : Les complexes du technétium 99 m qui présentent une fixation et un métabolisme sélectifs occupent une place prépondérante en médecine nucléaire : parmi eux se trouvent les phosphonates remarquables pour leur tropisme osseux.

L'objet de ce travail est l'étude de la complexation de l'étain stanneux et du technétium 99 m par l'hydroxyméthylène diphosphonate en fonction du rapport H.M.D.P./Sn.
Nous avons déterminé la charge, la taille et l'analyse élémentaire des différents complexes.

L'étude de la répartition biologique et l'épuration sanguine chez le rat montre que le complexe qui possède la charge négative la plus élevée présente la meilleure fixation osseuse.

MOTS CLES : H.M.D.P (hydroxyméthylène diphosphonate)
Complexe H.M.D.P. - Sn - Tc
Charge
Biodistribution